

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Pathophysiologie der p.A167V-Mutation von KCNJ10



INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN (DR. MED.)

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

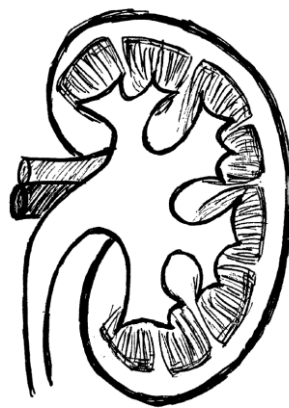
FELIZITAS TONDORF

REGENSBURG 2016

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Pathophysiologie der p.A167V-Mutation von KCNJ10



INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN (DR. MED.)

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

FELIZITAS TONDORF

REGENSBURG 2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Warth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan Jantsch

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 24. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Distaler Tubulus	2
1.2 EAST-Syndrom	3
1.2.1 Phänotyp.....	3
1.2.2 Molekulare Grundlagen	4
1.3 KCNJ10.....	4
1.3.1 Struktur und Funktion von KCNJ-Kanälen.....	4
1.3.2 Eigenschaften und Lokalisation von KCNJ10	5
1.3.3 Interaktion mit KCNJ16.....	6
1.4 Die Mutation A167V	6
1.4.1 Schwacher Phänotyp homomerer KCNJ10 A167V-Kanäle	6
1.4.2 Ausgeprägter Phänotyp durch Ko-Expression mit KCNJ16.....	7
1.4.3 Möglichkeit der veränderten Oberflächenexpression.....	7
1.5 Zielsetzung	8
2 Methoden.....	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Lösungen.....	9
2.1.2 Zellen	12
2.1.3 Sonstiges Material.....	13
2.2 Zellkultur	14
2.2.1 Elektroporation von CHO- und HEK-Zellen	14
2.2.2 Ko-Transfektion mit KCNJ16.....	15
2.3 Patch-Clamp-Technik.....	15
2.3.1 Vorbereiten der Zellen	15
2.3.2 Allgemeine Funktionsweise der Patch-Clamp-Technik.....	16
2.3.3 Ganzzellaufbauten.....	17
2.3.4 Einzelkanalmessungen	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Ganzzellaufbauten.....	20
3.1.1 Ruhemembranpotential	20
3.1.2 Strom-Spannungs-Kurven bei homomerer Expression von KCNJ10.....	21
3.1.3 Strom-Spannungs-Kurven bei Ko-Expression mit KCNJ16.....	22
3.1.4 Strom-Spannungs-Kurven bei veränderter Pipettenlösung	22
3.2 Pharmakologie.....	25

3.3	Einzelkanalmessungen	25
4	Diskussion	29
4.1	Bedeutung von KCNJ10	29
4.2	Geringer Funktionsverlust von KCNJ10 A167V-Homomeren.....	29
4.3	KCNJ10/KCNJ16-Heteromere für Nierenphänotyp pathogenetisch.....	30
4.4	Einfluss von ADP auf die Funktion heteromerer A167V Kanäle	33
4.5	Ausblick.....	36
5	Zusammenfassung.....	38
6	Verzeichnisse.....	39
6.1	Literaturverzeichnis.....	39
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	42
6.3	Tabellenverzeichnis.....	43
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	44
7	Anhang	45
7.1	Danksagung	45
7.2	Lebenslauf.....	46
7.3	Eidestättliche Erklärung	48

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

1.1.1 Allgemeines

Die Niere erfüllt vielfältige Aufgaben, wie beispielsweise die Eliminierung harnpflichtiger Substanzen und die Regulation von Blutdruck, Blutbildung und Knochenmineralisation. Ihre wichtigste Aufgabe ist jedoch die Kontrolle des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts. Dazu bildet sie täglich bis zu 180 l Primärharn, der in den Glomeruli aus dem Blut abfiltriert wird. Der Primärharn passiert dann das Tubulussystem. Dieses setzt sich aus funktionell und morphologisch unterschiedlichen Abschnitten zusammen, wie in Abbildung 1 verdeutlicht wird. Hier wird das innere Milieu des Körpers über die Rückresorption von Wasser und gelösten Teilchen ins Blut und über die Sekretion harnpflichtiger Substanzen in den Urin reguliert.

Im proximalen Tubulus werden ca. $\frac{2}{3}$ des filtrierten Wassers und Kochsalzes rückresorbiert. Diese hohe Transportkapazität spiegelt sich morphologisch in einem hohen, mitochondrienreichen Epithel mit verhältnismäßig „lecken“ Schlussleisten wieder, die eine parazelluläre Diffusion von Wasser und Elektrolyten ermöglichen. Die Mitochondrien stellen Energie für die basolateral lokalisierte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ bereit, die hier, wie auch in den meisten anderen Tubulusabschnitten, die Triebkraft für die luminalen Transportvorgänge liefert.

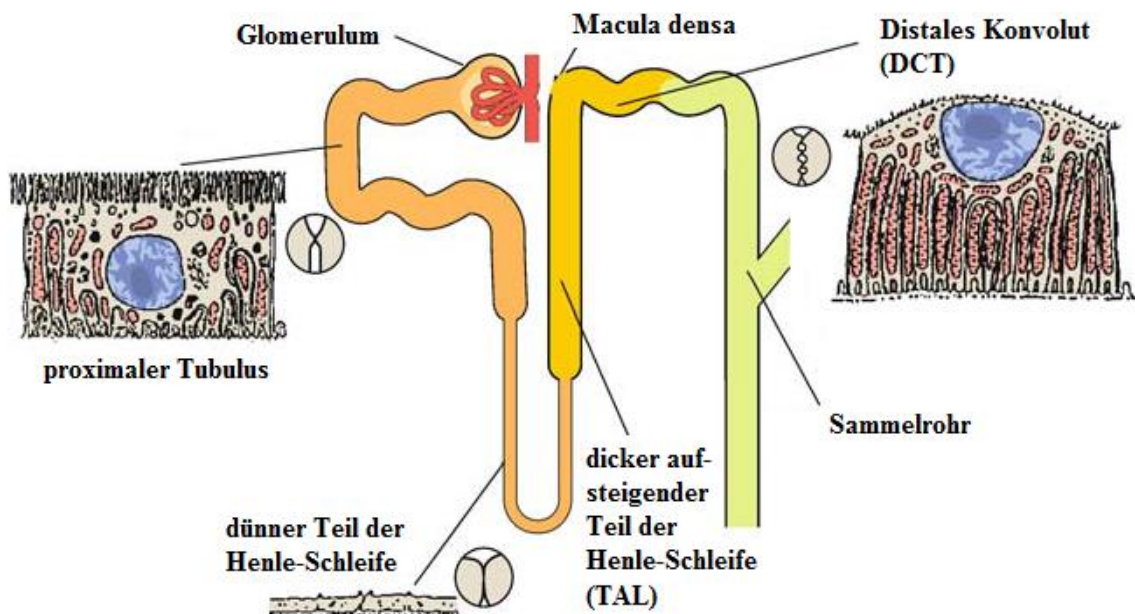


Abbildung 1: Nephronabschnitte mit dazugehörigem Epithel. Modifiziert nach Schmidt, Lang 2007 [1].

Im flachen Epithel des dünnen Teils der Henle-Schleife finden kaum aktive Transportprozesse statt. Der dicke, aufsteigende Teil der Henle-Schleife entzieht dem Harn hauptsächlich über den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) Elektrolyte, ist aber wasserundurchlässig. Dadurch sinkt die Osmolalität in Richtung Nierenrinde wieder. Das Epithel ist hier wieder hoch und mitochondrienreich.

Im distalen Tubulus und im Sammelrohr können Transportprozesse gegen einen hohen Gradienten erfolgen, da die dort ebenfalls mitochondrienreichen Tubuluszellen dichte Schlussleisten aufweisen. Hier findet in erster Linie die Feinjustierung der Urinzusammensetzung statt, es werden aber immerhin noch ca. 10 % des filtrierten Natriums rückresorbiert.

1.1.2 Distaler Tubulus

Als distaler Tubulus wird der Abschnitt zwischen der Macula densa und dem Sammelrohr bezeichnet. Dazu gehören das distale Konvolut (Pars convoluta des distalen Tubulus), das Verbindungsstück (CNT, connecting tubule) und der anfängliche Teil des Sammelrohrs (CCD, cortical collecting duct) [2]. Je nach Expression unterschiedlicher Proteine wird beim distalen Konvolut noch in einen frühen und einen späten Teil unterschieden (DCT1 und DCT2, distal convoluted tubule) [3].

Die Resorption von Na^+ und Ca^{2+} erfolgt nach Bedarf und wird über Hormone wie Aldosteron und Parathormon gesteuert. Des Weiteren wird im distalen Tubulus Mg^{2+} rückresorbiert, und H^+ und K^+ werden sezerniert.

Die Triebkraft für diese Transportprozesse ist wiederum die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Indem sie Na^+ basolateral aus der Zelle ausschleust, sorgt sie dafür, dass Na^+ luminal durch den NaCl -Cotransporter (NCC, v.a. im DCT1) und den epithelialen Natriumkanal (ENaC, v.a. in DCT2, CNT und CCD) in die Zelle aufgenommen werden kann [3]. Dabei kann die Menge an extrazellulär verfügbarem K^+ für die Funktion der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ limitierend sein. Kaliumionen können aber aus dem Zellinneren über basolaterale K^+ -Kanäle wieder nach draußen gelangen, um der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ erneut zur Verfügung zu stehen. Dieses Prinzip wird als „pump-leak-coupling“ bezeichnet [4].

Der funktionell bedeutendste dieser basolateralen K^+ -Kanäle ist der einwärtsgerichtete K^+ -Kanal KCNJ10, der im distalen Tubulus vor allem als Heterotetramer mit KCNJ16, einem ihm verwandten Kanalprotein, vorkommt [5,6]. Neben dem oben beschriebenen K^+ -Recycling sorgen diese Kanäle für ein hyperpolarisiertes Membranpotential, das als Triebkraft für den basolateralen Ausstrom von Cl^- und andere Transportprozesse dient [3]. Die wichtigsten

Membranproteine des distalen Tubulus und die von ihnen transportierten Ionen sind in Abbildung 2 veranschaulicht.

Störungen des distalen Tubulus, wie sie beispielsweise beim Gitelman-Syndrom, einem genetisch bedingten Ausfall des NCC, oder durch Einnahme eines Thiazid-Diuretikums (medikamentöse Hemmung des NCC) auftreten, äußern sich in Serumelektrolytverschiebungen. Es kommt vor allem zu Hypokaliämie, Alkalose, Hypomagnesiämie und Hypokalzurie. Die zu erwartende Hyponatriämie bleibt meist aus, da Na^+ und auch Ca^{2+} im proximalen Tubulus kompensatorisch vermehrt resorbiert werden, wodurch sich auch die

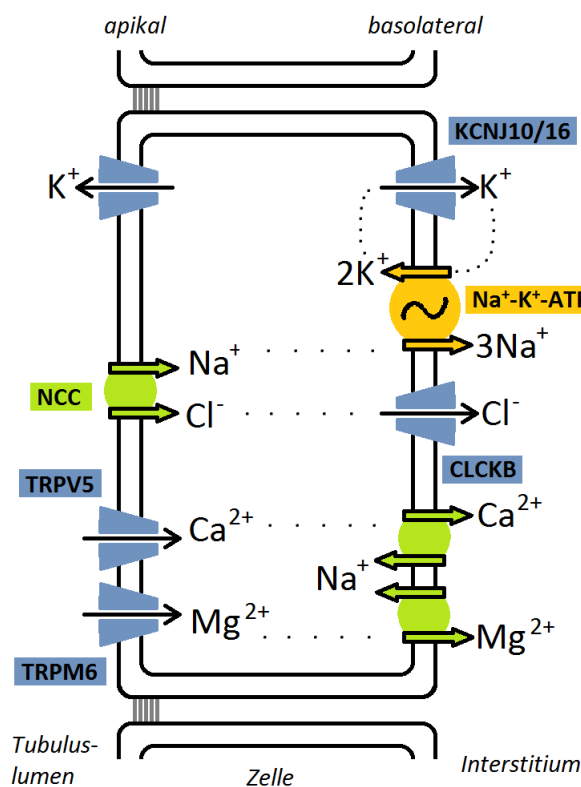


Abbildung 2: Transportprozesse im distalen Konvolut (DCT).

Hypokalzurie erklären lässt [7]. Weiterhin wird der Na^+ -Verlust über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und damit einer Erhöhung der Salzresorption über den ENaC ausgeglichen. Die gesteigerte ENaC-Aktivität im Sammelrohr führt allerdings zur Sekretion von H^+ und K^+ , was die Alkalose und die Hypokaliämie bedingt [3]. Wie es zum Mg^{2+} -Verlust kommt, ist bislang nicht ganz geklärt; möglicherweise wird die Expression des luminalen Mg^{2+} -Kanals TRPM6 durch Aldosteron unterdrückt [7].

1.2 EAST-Syndrom

1.2.1 Phänotyp

2009 wurde ein dem Gitelman-Syndrom ähnliches Krankheitsbild beschrieben, bei dem neben dem tubulären Salzverlust noch extrarenale Symptome hinzukommen: Die Patienten leiden schon als Kleinkinder unter Krampfanfällen, später fallen Gangataxie und Innenohrschwerhörigkeit auf. Diese Kardinalsymptome sind in der Krankheitsbezeichnung, dem Akronym EAST (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy), zusammengefasst [8]. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete darüber hinaus noch eine mentale Retardierung, die in deren Bezeichnung für diese Erkrankung, SeSAME-Syndrom (seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, epilepsy), Eingang findet [9].

1.2.2 Molekulare Grundlagen

Als Ursache dieser Erkrankung wurden homozygote oder compound-heterozygote Mutationen des Gens KCNJ10 gefunden. Die bisher gefundenen Mutationen R65P, C140R, T164I, A167V, R199X, R297C [9], G77R [8], R175Q [10], R65C, F75L, V259fsX259 [11], T57I [12], F75C, V91fs197X [13] betreffen Aminosäuren, die in homologen Proteinen anderer Wirbeltiere hoch konserviert sind. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Mutationen die Kanalfunktion in unterschiedlichen Schweregraden beeinträchtigen [10–16], bei einigen ist auch die Oberflächenexpression gestört [12,14–17] oder das pH-Optimum stark verschoben [10,15,16].

1.3 KCNJ10

1.3.1 Struktur und Funktion von KCNJ-Kanälen

Der beim EAST-Syndrom betroffene Kanal KCNJ10 ($K_{ir}4.1$) gehört zu den einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen, auch als K_{ir} -Kanäle (K_{ir} = inwardly rectifying K^+ -channel) oder KCNJ-Kanäle bezeichnet. Einwärtsgerichtung bedeutet, dass diese Kanäle den Einstrom von Kationen wie K^+ bei negativer Spannung besser leiten als deren Ausstrom bei gleich großer positiver Spannung [18]. Es gibt 15 KCNJ-Kanäle in 7 Subfamilien, die in vielen Geweben eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören vor allem ZNS, Herz, Niere und endokrine Organe [19]. Störungen dieser Kanäle lösen spezifische Krankheitsbilder aus, z.B. das Bartter-Syndrom Typ II durch eine Mutation von KCNJ1 ($K_{ir}1.1$, ROMK) oder den kongenitalen Hyperinsulinismus durch eine Mutation von KCNJ11 ($K_{ir}6.2$) [20].

Der Aufbau von KCNJ-Kanälen ähnelt dem der meisten K^+ -Kanäle. Diese integralen Membranproteine sind ein aus vier Untereinheiten zusammengesetztes Tetramer [21]. Dabei können die Untereinheiten gleichartig sein (Homotetramer), oder von zwei unterschiedlichen KCNJ-Vertretern stammen (Heterotetramer). Jede Untereinheit besteht dabei aus zwei Transmembran-

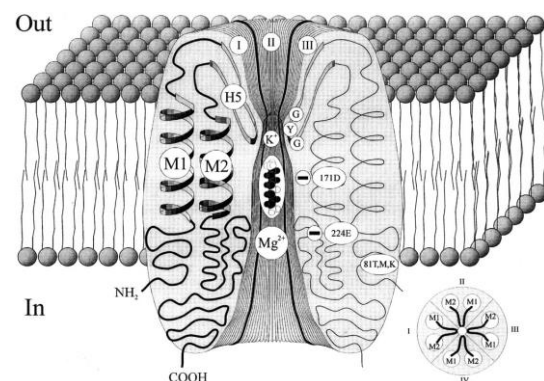


Abbildung 3: Struktur von KCNJ-Kanälen

Entnommen aus Parrock *et al.* 2013 [13].

domänen (M1 und M2), einer Poren-Region (H5) und den zytosolisch lokalisierten N- und C-Termini. Diese Struktur ist in Abbildung 3 dargestellt. Einige KCNJ-Kanäle können auch mit anderen, nicht verwandten Proteinen (z.B. mit G-Proteinen oder Sulfonylharnstoffrezeptoren) assoziieren, um Kanäle mit anderen Eigenschaften zu bilden [20].

1.3.2 Eigenschaften und Lokalisation von KCNJ10

KCNJ10 ist ein seit 1995 bekanntes Mitglied der KCNJ-Familie, das im Vergleich zu anderen KCNJ-Kanälen weniger stark einwärtsgerichtet [22]. Auf Einzelkanalebene ist beschrieben, dass der Kanal nahezu durchgehend geöffnet ist und einen Leitwert von circa 12 pS aufweist [23]. Abbildung 4 zeigt die zu vermutende Membrantopologie von KCNJ10. Die Stellen bekannter Mutationen sind rot

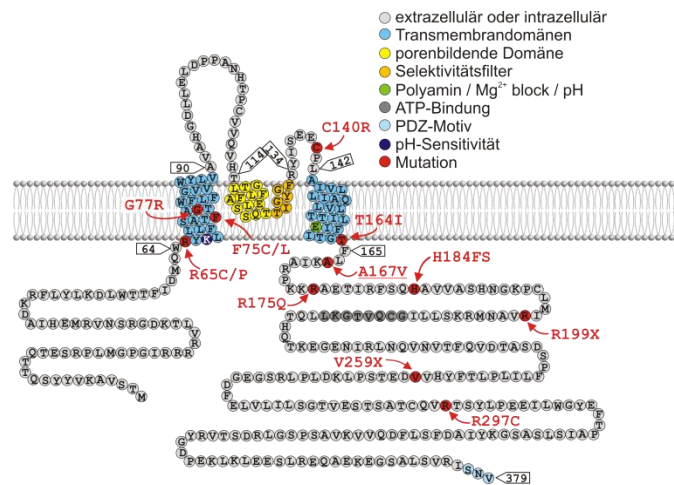


Abbildung 4: Membrantopologie von KCNJ10.

Neben seiner Expression im distalen Tubulus der Niere [10] kommt KCNJ10 im Innenohr und im ZNS vor. Im Innenohr ist KCNJ10 in Zellen der Stria vascularis der Cochlea lokalisiert und trägt zur Bildung von Endolymphe und endokochleärem Potential bei [24]. Im ZNS findet man KCNJ10 in Gliazellen, vor allem in Astrozytenfortsätzen um Synapsen und Blutgefäße [25], sowie in Zellkörpern von Oligodendrozyten, in der Bergmann-Glia im Kleinhirn und in Müller-

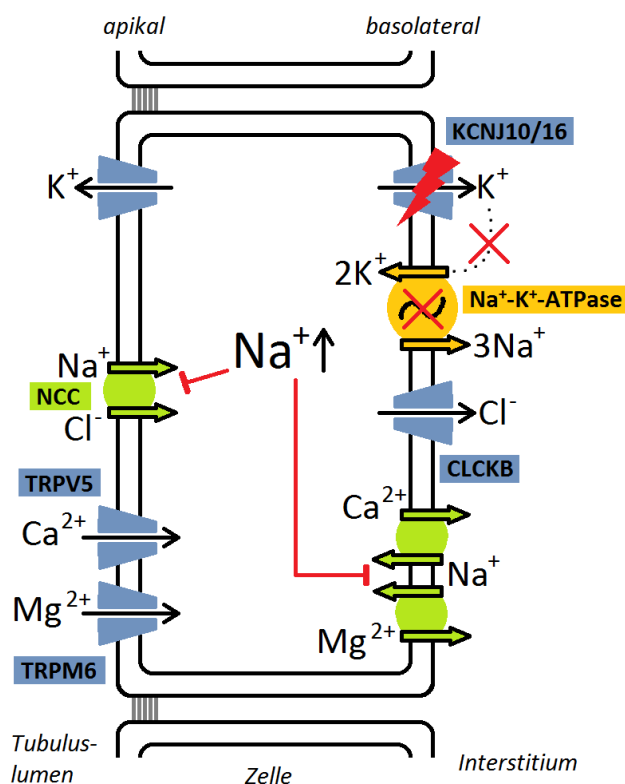


Abbildung 5: Auswirkung von KCNJ10-Mutationen auf die Elektrolytresorption im DCT.

Zellen der Retina [26]. Hier trägt KCNJ10 vermutlich vor allem dazu bei, dass K^+ , das sich durch das Repolarisieren der Neurone im Extrazellulärraum anhäuft, in die Gliazellen aufgenommen und umverteilt werden kann (sogenanntes „ K^+ spatial buffering“). Eine gestörte Funktion von KCNJ10 resultiert in einer verlängerten neuronalen Depolarisation und in einer herabgesetzten Krampfschwelle [9]. Die Symptome Innenohrschwerhörigkeit, Ataxie und Epilepsie, die beim EAST-Syndrom auftreten, unterstreichen die Bedeutung von KCNJ10 in ZNS und Innenohr.

Wie oben beschrieben ist KCNJ10 eine essentielle Komponente für die Salzresorption im distalen Tubulus. Die Auswirkungen eines mutierten Kanals auf die dortigen Transportprozesse sind in Abbildung 5 verdeutlicht. Fehlt KCNJ10, so steht zu wenig extrazelluläres K^+ für die Na^+/K^+ -ATPase zur Verfügung. Na^+ akkumuliert somit in der Zelle, und die Triebkraft für die NaCl-Aufnahme durch den NCC fehlt. Weiterhin wird der sekundär-aktive Transport von Magnesium und Kalzium blockiert (wobei der Kalziumverlust im proximalen Tubulus überkompensiert wird), und es geht vermehrt Kalium verloren. So entsteht ein dem Gitelman-Syndrom ähnlicher Nierenphänotyp.

1.3.3 Interaktion mit KCNJ16

KCNJ10 kann mit KCNJ16 ($K_{ir}5.1$) Heterotetramere ausbilden, die sich in ihren Eigenschaften deutlich von den KCNJ10-Homotetrameren unterscheiden. Sie zeigen eine geringere Offenwahrscheinlichkeit, dafür aber einen höheren Leitwert von bis zu 43 pS [23] und eine stärkere pH-Abhängigkeit [27]. Außerdem sind sie deutlich stärker einwärtsgerichtet, und es können klar abgrenzbare, niedrigere Leitfähigkeitslevel beobachtet werden, sogenannte “sub-states“ [23]. An der Assoziation sind vermutlich mehrere Regionen von KCNJ10 beteiligt, eine Schlüsselfunktion kommt aber der zweiten Transmembrandomäne zu [28]. Dabei assoziieren die Untereinheiten vermutlich abwechselnd miteinander, also 10-16-10-16, wie in Abbildung 6 dargestellt. Bilden hingegen vier KCNJ10-Untereinheiten einen Kanal, so wird dieser als homomerer Kanal oder Homotetramer bezeichnet. KCNJ16 alleine ist nicht dazu fähig, funktionelle Kanäle auszubilden [23].

In vivo spielt die Heteromerisation von KCNJ10 mit KCNJ16 vor allem in der Niere eine Rolle, wo die KCNJ10/KCNJ16-Heterotetramere im distalen Tubulus die wichtigsten basolateralen Kaliumkanäle darstellen [5,6]. Auch in der Retina kommen solche heterotetrameren Kanäle vor [29], in Innenohr [30] und Gehirn [27] hingegen wahrscheinlich nicht. Dort werden zwar auch beide Proteine exprimiert, haben aber vermutlich unterschiedliche physiologische Partnerproteine und Aufgaben [27,30].

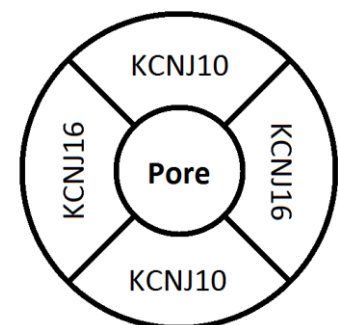


Abbildung 6: Heteromerisation mit KCNJ16.

1.4 Die Mutation A167V

1.4.1 Schwacher Phänotyp homomerer KCNJ10 A167V-Kanäle

Die Mutation A167V gehört zu den Ersten, die beschrieben wurden. Zunächst wurde Sie jedoch nur in zwei compound-heterozygoten Patienten zusammen mit der Mutation R297C

gefunden [9]. Da homomere Kanäle mit dieser A167V-Mutation eine Restfunktion von ~ 60 % zeigen, wurde diese Mutation zunächst als per se benigne betrachtet [15]. Man ging davon aus, dass sie lediglich in Kombination mit einer schwerwiegenderen Mutation wie R297C krankheitsverursachend sei [16].

1.4.2 Ausgeprägter Phänotyp durch Ko-Expression mit KCNJ16

2013 beschrieben Parrock *et al.* 3 Patienten, die die Mutation A167V in homozygotem Zustand aufweisen und an Ataxie, Innenohrschwerhörigkeit und einem Salzverlustsyndrom leiden. Diese Symptome des EAST-Syndroms können durch eine 60 %ige Restfunktion von KCNJ10 nicht erklärt werden, denn dann müssten auch heterozygote Träger von Mutationen, die einen vollständigen Funktionsverlust bewirken, einen ähnlichen Phänotyp zeigen [13].

Sala-Rabanal *et al.* (2010) war bereits aufgefallen, dass KCNJ10 A167V in Ko-Expression mit KCNJ16 einen stärkeren Funktionsverlust zeigt als in homomerer Expression [15]. Parrock *et al.* stellten in elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus* Oozyten einen vollständigen Funktionsverlust der A167V-Mutante durch Heteromerisation mit KCNJ16 fest und sahen darin den Grund, weshalb ihre Patienten symptomatisch sind [13].

KCNJ10 A167V wurde bisher von 4 Arbeitsgruppen untersucht [13–16]. Die Ergebnisse weichen mitunter stark voneinander ab und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung publizierter Ergebnisse zu KCNJ10 A167V

	Expressions- system	Restfunktion (% vom WT)		Oberflächenexpression KCNJ10 A167V
		J10 A167V	J10 A167V/J16 WT	
Tang <i>et al.</i> 2010 [14]	HEK293	~ 7 %	~ 23 % ¹	keine drastische Einschränkung vermindert
Sala-Rabanal <i>et al.</i> 2010 [15]	COSm6	~ 60 %	~ 18 % ¹	
Williams <i>et al.</i> 2010 [16]	<i>Xenopus</i> Oozyten	~ 60 %	~40 % ²	vermindert ³
Parrock <i>et al.</i> 2013 [13]	<i>Xenopus</i> Oozyten	~ 60 %	~ 2 % ⁴	nicht untersucht

1.4.3 Möglichkeit der veränderten Oberflächenexpression

Inwiefern KCNJ10 A167V an der Zelloberfläche exprimiert wird, ist ebenfalls strittig. Einige Arbeitsgruppen sahen in ihren Expressionssystemen eine vermindert Oberflächenexpression

¹ Stöchiometrie (KCNJ16:KCNJ10) = 1:1

² Stöchiometrie (KCNJ16:KCNJ10) = 10:1

³ Zur Untersuchung der Oberflächenexpression verwendeten Williams *et al.* HEK293-Zellen

⁴ Stöchiometrie (KCNJ16:KCNJ10) = 3:1

[15,16] und erachten dies zum Teil als Grund für die leichte Reduktion der Ganzzellströme bei homomerer Expression von KCNJ10 A167V im Vergleich zum Wildtyp [15].

Tanemoto *et al.* (2014) schlugen einen anderen Mechanismus für die Pathogenität der A167V-Mutation vor. Sie beobachteten eine gestörte Interaktion mit Proteinen, die eine gezielte Expression an der basolateralen Seite der Tubuluszellen ermöglichen. Dadurch komme es in den meisten Zelllinien (wie beispielsweise HEK-Zellen) zwar zu einer nahezu normalen Oberflächenexpression, in tubulären Zelllinien wie MDCKII (und eben in den Tubuluszellen der Patienten) aber nicht. Für die basolaterale Expression von KCNJ10 ist die Interaktion mit dem Gerüstprotein MAGI-1 wichtig. Da MAGI-1 aber basolateral fixiert ist, muss KCNJ10 zu MAGI-1 hin transportiert werden bzw. die beiden Proteine müssten bereits im endoplasmatischen Retikulum assoziieren. Diese Mechanismen könnten durch die A167V-Mutation gestört sein [17].

1.5 Zielsetzung

Die elektrophysiologischen Erkenntnisse zur A167V-Mutation sind gerade in Säugerzellen uneinheitlich. Außerdem sind die Untersuchungen zur Ko-Expression von KCNJ10 A167V mit KCNJ16 in Säugerzellen stets in einer 1:1- Stöchiometrie durchgeführt worden, da lediglich geprüft werden sollte, ob durch Ko-Expression mit KCNJ16 die Restfunktion der Mutanten erhöht werden kann. Bei einer 1:1-Stöchiometrie ist eine Verfälschung des Stromes durch eine mögliche Bildung von KCNJ10 A167V-Homomeren sehr wahrscheinlich.

Daher wurden in dieser Arbeit die elektrophysiologischen Eigenschaften der A167V-Mutation eingehender untersucht. Für die Ganzzell-Messungen wurden CHO-Zellen verwendet. Diese sind ebenfalls Säugerzellen und haben den Vorteil, dass sie relativ wenige endogene Kanäle exprimieren, die den Strom verfälschen könnten. Für die heteromere Expression von KCNJ10 mit KCNJ16 wurde eine 1:10 Stöchiometrie gewählt, um die Bildung von KCNJ10-Homomeren weitestgehend zu vermeiden. Zudem wurden Einzelkanalmessungen der KCNJ10/KCNJ16 Heteromere durchgeführt, was bei der A167V-Mutation bisher nicht erfolgt ist.

Weiterhin wurden mögliche aktivierende Einflüsse des zellinneren Milieus auf die Funktion der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere untersucht. Die Kenntnis aktivierender Faktoren könnte als Basis für den gezielten Einsatz von Medikamenten zur Behandlung des EAST-Syndroms führen.

2 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen

Tabelle 2: Ringerlösung

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
Hepes	238,31	1,192		5
NaCl	58,44	8,474		145
K ₂ HPO ₄	228,23	0,365		1,6
KH ₂ PO ₄	136,09	0,054		0,4
D-Glucose	198,00	0,990		5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		1,0	1
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		1,3	1,3
Milli-Q H ₂ O				<i>ad</i> 1000 mL
NaOH				pH 7,4 einstellen

Tabelle 3: Ringer Hochkalium 15

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
Hepes	238,31	1,192		5
NaCl	58,44	7,808		133,6
KCl	74,56	0,850		11,4
K ₂ HPO ₄	228,23	0,365		1,6
KH ₂ PO ₄	136,09	0,054		0,4
D-Glucose	198,00	0,990		5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		1,000	1
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		1,300	1,3
Milli-Q H ₂ O				<i>ad</i> 1000 mL
NaOH				pH 7,4 einstellen

Tabelle 4: Ringer Hochkalium 50

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
Hepes	238,31	1,192		5
NaCl	58,44	5,762		58,44
KCl	74,56	3,46		46,4
K ₂ HPO ₄	228,23	0,365		1,6
KH ₂ PO ₄	136,09	0,054		0,4
D-Glucose	198,00	0,990		5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		1,000	1
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		1,300	1,3
Milli-Q H ₂ O				<i>ad</i> 1000 mL
NaOH				pH 7,4 einstellen

Tabelle 5: Barium in Ringer

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
BaCl ₂ (1 M Stocklösung)	244,27		0,050	1
Ringer-Lösung (siehe Tabelle 2)				<i>ad 50 mL</i>

Tabelle 6: Diazoxid in Hochkalium 50

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
Diazoxid (10 ⁻² M Stocklösung)	230,7		0,050	0,01
Ringer Hochkalium 50 (siehe Tabelle 4)				<i>ad 50 mL</i>

Tabelle 7: Tolbutamid in Hochkalium 50

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
Tolbutamid (10 ⁻¹ M Stocklösung)	270,4		0,005	0,01
Ringer Hochkalium 50 (siehe Tabelle 4)				<i>ad 50 mL</i>

Tabelle 8: Pipettenlösung 4

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
D-Kaliumgluconat	234,25	2,225		95
KCl	74,56	0,224		30
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,017		1,2
Na ₂ HPO ₄	177,99	0,085		4,8
D-Glucose	198,00	0,099		5
EGTA	380,40	0,038		1
Na ₂ ATP	551,00	0,165		3
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		0,238	2,38
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		0,073	0,726
Milli-Q H ₂ O				<i>ad 100 mL</i>
KOH, HCL				pH 7,2 einstellen

Tabelle 9: Mg²⁺-freie Pipettenlösung

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
D-Kaliumgluconat	234,25	2,225		95
KCl	74,56	0,224		30
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,017		1,2
Na ₂ HPO ₄	177,99	0,085		4,8
D-Glucose	198,00	0,099		5
EGTA	380,40	0,038		1
Na ₂ ATP	551,00	0,165		3
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		0,073	0,726
Milli-Q H ₂ O				<i>ad 100 mL</i>
KOH, HCL				pH 7,2 einstellen

Tabelle 10: Pipettenlösung mit ADP und Phosphat

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
D-Kaliumgluconat	234,25	0,556		95
KCl	74,56	0,056		30
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,004		1,2
Na ₂ HPO ₄	177,99	0,021		4,8
K ₂ HPO ₄	228,23	0,017		3
D-Glucose	198,00	0,025		5
EGTA	380,40	0,095		1
Na ₂ -ATP	551,00	0,021		1,5
K-ADP	501,32	0,019		1,5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		0,060	2,38
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		0,018	0,726
Milli-Q H ₂ O				<i>ad 25 mL</i>
KOH, HCL				pH 7,2 einstellen

Tabelle 11: Pipettenlösung mit ADP

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
D-Kaliumgluconat	234,25	0,556		95
KCl	74,56	0,056		30
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,004		1,2
Na ₂ HPO ₄	177,99	0,021		4,8
D-Glucose	198,00	0,025		5
EGTA	380,40	0,095		1
Na ₂ ATP	551,00	0,021		1,5
K-ADP	501,32	0,019		1,5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		0,060	2,38
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		0,018	0,726
Milli-Q H ₂ O				<i>ad 25 mL</i>
KOH, HCL				pH 7,2 einstellen

Tabelle 12: Pipettenlösung mit niedrigem ATP-Gehalt

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
D-Kaliumgluconat	234,25	0,556		95
KCl	74,56	0,056		30
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,004		1,2
Na ₂ HPO ₄	177,99	0,021		4,8
K ₂ HPO ₄	228,23	0,017		3
D-Glucose	198,00	0,025		5
EGTA	380,40	0,095		1
Na ₂ ATP	551,00	0,021		1,5
MgCl ₂ (1 M Stocklösung)	203,30		0,045	2,38
CaCl ₂ (1 M Stocklösung)	147,02		0,018	0,726
Milli-Q H ₂ O				<i>ad 25 mL</i>
KOH, HCL				pH 7,2 einstellen

Tabelle 13: Referenzelektrodenlösung

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
KCl	74,56	3,728		1000
Milli-Q H ₂ O				<i>ad</i> 50mL

Tabelle 14: CHO-Medium

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
FCS			50,0	
L-Glutamin ($2 \cdot 10^{-2}$ M)			5,00	2
Natrium-Pyruvat (10^{-2} M)			5,00	1
Penicillin/Streptomycin-Lösung			2,50	50 I.E./100 µg/ml
MEM Alpha Medium				<i>ad</i> 500mL

Tabelle 15: HEK-Medium

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
FCS			50,0	
Penicillin/Streptomycin-Lösung			5,00	100 I.E./200 µg/ml
MEM Alpha Medium				<i>ad</i> 500mL

Tabelle 16: Coating-Medium

Stoff	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage (g)	eingesetzte Stocklösung (mL)	Konzentration (mmol/L)
BSA		1,875		
Kollagen		1,000		
Fibronektin		0,500		
Penicillin/Streptomycin-Lösung			0,5	50 I.E./100 µg/ml
F-12 Nutrient Mixture Medium				<i>ad</i> 50mL

2.1.2 Zellen

Tabelle 17: Zellarten

Zelllinie		Hersteller
CHO	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters	Cell Lines Service, Eppelheim, D
HEK	Humane embryonale Nierenzellen	Cell Lines Service, Eppelheim, D

Tabelle 18: Plasmide

Insert	Vektor	Resistenz	Mutation
hKCNJ10	pIRES CD8	Ampicillin	- (WT)
hKCNJ10	pIRES CD8	Ampicillin	A167V
hKCNJ16	pIRES CD8	Ampicillin	- (WT)

2.1.3 Sonstiges Material

Tabelle 19: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage (GR-120)	A&D Instruments, Tokio, J
Elektroporationsgerät (Neon)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Inkubator (Heraeus)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Invertmikroskop (Axiovert 10)	Zeiss, Jena, D
Invertmikroskop (Axiovert 200)	Zeiss, Jena, D
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mikromanipulator	Scientifica, Uckfield, UK
Milli-Q-Anlage (Biocel A10)	Millipore, Schwalbach/Ts., D
Oszilloskop	Hameg Instruments, Mainhausen, D
pH-Meter	Schott Geräte, Mainz, D
Puller (DMZ Universal Puller)	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
Pumpe (PPS2)	Multi Channel Systems GmbH, Reutlingen, D
Sterilbank (Holten LaminAir 1.2)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Verstärker (ähnlich EPC-7)	U. Fröbe und R. Busche, Institut für Physiologie, Freiburg, D
Verstärker (EPC-10)	HEKA Elektronik, Lambrecht, D
Vortexer (Vortex Genie)	Scientific Industries, New York, USA
Waage (EK-600H)	A&D Instruments Ltd., Tokio, J
Wasserbad (W19)	Haake, Karlsruhe, D
Wipp-Schüttler (Minirocker MR1)	BioSan, Riga, LV

Tabelle 20: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Deckgläser rund	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, D
Glaskapillaren (GC 150-F 7.5)	Harvard Apparatus LTD, Edenbridge, UK
Kulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kulturschalen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (1,5µL)	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 21: Substanzen

Produkt	Hersteller
BaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bovines Fibronektin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO USA
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Diazoxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
D-Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
DynaBeads (anti-CD8)	Invitrogen, Karlsruhe, D
EGTA	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
F-12 Nutrient Mixture Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hepes	AppliChem, Darmstadt, D
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, D

Tabelle 21: Substanzen (fortgesetzt)

Produkt	Hersteller
K-ADP	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, D
KOH	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Kollagen (aus Kälberhaut)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin, 200 mM	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Na ₂ -ATP	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
NaCl	VWR Chemicals, Leuven, B
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Silikon-Hochvakuumfett	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tolbutamid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10-fach)	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA	

Tabelle 22: Verwendete Software

Produkt	Hersteller
LabChart 7	ADInstruments GmbH, Spechbach, D
Patch-Master v2x35	HEKA Elektronik, Lambrecht, D

2.2 Zellkultur

2.2.1 Elektroporation von CHO- und HEK-Zellen

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften von KCNJ10- und KCNJ10/KCNJ16-Kanälen zu untersuchen, wurden diese in immortalisierten Zelllinien überexprimiert. Zur Messung der Ganzzellströme wurden CHO-Zellen verwendet. Für die Einzelkanalmessungen wurden HEK-Zellen gewählt, da diese in Patch-Clamp Experimente häufiger zu erfolgreichen Experimenten führen als CHO-Zellen. Da hier nur einzelne Kanäle vermessen werden, spielt der höhere Anteil endogener Kanäle keine Rolle.

Die Transfektion dieser Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch einen kurzen Strompuls vorübergehend für Fremd-DNA permeabel gemacht. Nach der Aufnahme des Plasmids exprimiert die Zelle dann für eine gewisse Zeit die darauf enthaltenen Gene (transiente Transfektion).

Für dieses Verfahren wurden die Zellen in Suspension gebracht und dann die gewünschte Menge des entsprechenden Plasmids zugegeben. Bei den HEK-Zellen war das 1 µg Plasmid, bei

den CHO-Zellen 0,6 µg Plasmid + 0,4 µg leerer Vektor (pIRES CD8). Das Elektroporationsprotokoll sah bei den CHO-Zellen 2 Pulse mit einer Spannungsstärke von 1400 V und einer Dauer von 20 ms vor, bei den HEK-Zellen 2 Pulse von 1150 V und ebenfalls 20 ms.

Direkt im Anschluss wurden die Zellen in mediumgefüllte Schälchen mit beschichteten Glasplättchen gegeben. Diese Glasplättchen sind mit Kollagen und Fibronectin überzogen, damit die Zellen besser anwachsen können. Danach wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag für die Experimente verwendet.

2.2.2 Ko-Transfektion mit KCNJ16

Bei der Ko-Transfektion von KCNJ10 mit KCNJ16 ist problematisch, dass sich nicht nur die gewünschten KCNJ10/KCNJ16-Heteromere bilden, sondern dass auch immer die Möglichkeit besteht, dass sich vier KCNJ10-Untereinheiten zu einem homomeren Kanal zusammenlagern. Gerade im Fall der A167V-Mutation ist dies kritisch, da die Homomere relativ große Ströme zulassen. Diese würden die möglicherweise geringen Ströme der Heteromere überlagern und die Messung verzerren. Diese Gefahr besteht bei der KCNJ16-Untereinheit nicht, da KCNJ16 allein keine funktionellen Kanäle bildet.

Um eine Verfälschung der Messung durch KCNJ10-Heteromere zu vermeiden, wurde KCNJ16 in 10-fachem Überschuss eingesetzt. Im Falle der HEK-Zellen wurde also 0,1 µg KCNJ10-Plasmid und 0,9 µg KCNJ16-Plasmid eingesetzt. Bei den CHO-Zellen waren es 0,06 µg KCNJ10-Plasmid und 0,54 µg KCNJ16-Plasmid.

2.3 Patch-Clamp-Technik

2.3.1 Vorbereiten der Zellen

Um sicherzustellen, dass bei den Versuchen nur die erfolgreich transfizierten Zellen verwendet wurden, mussten diese kenntlich gemacht werden. Das gelang mit Hilfe von Anti-CD8-Dyna-Beads, kleinen Kügelchen, die mit Antikörpern gegen das humane Oberflächenprotein CD8 beschichtet sind. Die transfizierten Zellen exprimierten CD8, da es auf dem bicistronischen Plasmid mitkodiert war. Anti-CD8-Dyna-Beads binden somit spezifisch nur an Zellen, die ein oder mehrere Plasmide aufgenommen und CD8-Oberflächenproteine gebildet haben.

Pro Schale wurde 1 µL Dyna-Bead-Suspension in 1 mL Ringerlösung gelöst, gevortext und nach Absaugen des Mediums auf die Zellen gegeben. Nach 2 min Inkubationszeit auf einer

Wippe wurden die Zellen weitere 5 min mit Ringerlösung gewaschen, um nicht gebundene Beads zu entfernen.

Für die Experimente wurde das Glasplättchen mit den Zellen in die Messkammer („Bad“) eines Patch-Clamp-Messplatzes eingebracht. Dieser ist mit einem inversen Mikroskop ausgestattet, was bedeutet, dass die Objektive unter dem Objektisch angebracht sind. Dadurch bleibt oberhalb der Messkammer Platz, um an den Zellen zu arbeiten. Das Bad verfügt über einen Zu- und Ablauf, wobei die Zulaufgeschwindigkeit 2 mL/min betrug. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. An einem Tag wurden immer sowohl Wildtyp als auch Mutante untersucht.

2.3.2 Allgemeine Funktionsweise der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode der Elektrophysiologie, die es ermöglicht, Ströme durch einzelne Kanäle einer Zellmembran zu messen. Diese Ströme liegen im Bereich von wenigen Picoampere und können leicht durch „Leckströme“ – direkte Ströme zwischen Pipette und Bad – überlagert werden. Daher versucht man bei der Patch-Clamp-Technik, solche Leckströme zu verhindern, indem man den zu vermessenden Membranfleck (Patch) elektrisch isoliert.

Dazu ist die Messelektrode in einer dünnen Glaspipette untergebracht (siehe Abbildung 7). Deren Öffnung ist etwa $1\mu\text{m}$ groß und hat einen Widerstand von wenigen $\text{M}\Omega$. Für die hier beschriebenen Messungen wurden Pipetten mit einem Widerstand von 6-10 $\text{M}\Omega$ verwendet. Diese Pipette wird mit Hilfe eines Mikromanipulators unter lichtmikroskopischer Kontrolle sehr nah an eine Zelle, die sich in einem Bad befindet,

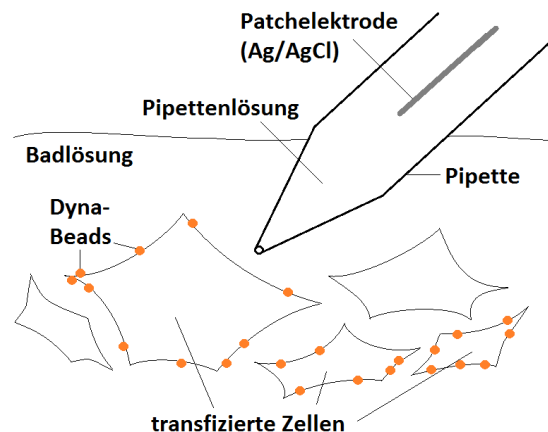


Abbildung 7: Patchpipette im Bad.

herangeführt. Dann wird ein leichter Unterdruck angelegt, sodass sich die Zellmembran sehr eng an die Pipettenspitze heftet. Diesen Zustand bezeichnet man als Gigaseal, weil die Pipette nun so stark gegen das Bad, in dem sich die Referenzelektrode befindet, elektrisch abgedichtet ist, dass der Widerstand zwischen Pipette und Badlösung im Gigaohmbereich liegt. Nun können keine seitlichen Leckströme die Messung mehr verfälschen. Zudem ist der Messplatz von einem faradayschen Käfig umgeben, um das elektromagnetische Hintergrundrauschen des öffentlichen Stromnetzes abzuschirmen.

Weiterhin basiert die Patch-Clamp-Technik auf dem Voltage-Clamp-Prinzip. Das bedeutet, dass die Zelle oder der Membranfleck unter der Pipette auf einem bestimmten Potential gehalten („geklemmt“) wird. So lassen sich die Ströme, die beim Anlegen bestimmter Spannungen fließen, messen, woraus das Leitfähigkeitsprofil der gesamten Zelle oder eines einzelnen Kanals bestimmt werden kann. Anstatt bestimmte Spannungswerte zu klemmen, kann man auch den Strom auf dem Wert null halten, um das Ruhemembranpotential der Zelle messen (Current-Clamp, CC-Zero-Modus). Ein Patch-Clamp-Versuch besteht oft aus einer Abfolge von verschiedenen Klemmspannungen und dem CC-Zero-Modus, was als Patch-Protokoll bezeichnet wird.

2.3.3 Ganzzelleableitungen

Bei Ganzzelleableitungen (Whole-cell-Modus) ist die Patchpipette und damit die Elektrode leitend mit dem Zellinneren verbunden (Siehe Abbildung 8C). Das erreicht man, indem man nach erfolgreichem Herstellen eines Gigaseals erneut einen Unterdruck anlegt. Dieser ist relativ stark und sorgt dafür, dass der Membranfleck unter der Pipette einreißt. Da das Zellvolumen im Vergleich zum Pipettenvolumen relativ klein ist, gleicht sich die Zusammensetzung des Zytoplasmas bald der der Pipettenlösung an. Daher sollte die Pipettenlösung dem Zytosol möglichst gut nachempfunden sein.

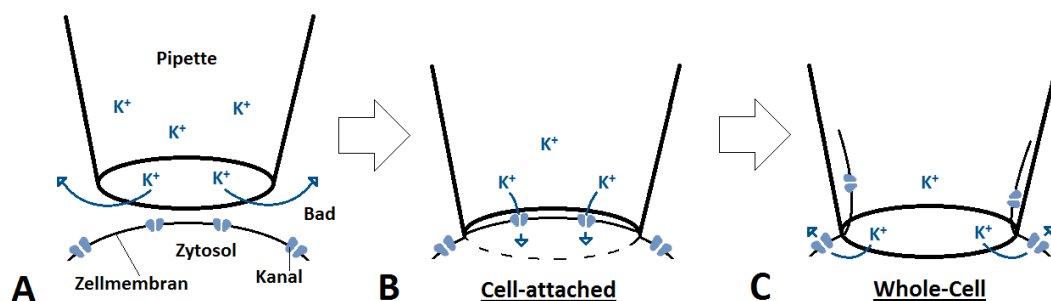


Abbildung 8: Patch-Clamp-Konfigurationen.

Für die Ganzzellmessungen wurden CHO-Zellen verwendet, da diese relativ wenige eigene Kanäle exprimieren und damit das Messergebnis nur geringfügig beeinflussen. Das verwendete Protokoll sah Klemmspannungen von -120 mV, -90 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und +30 mV vor, die jeweils für 2 s gehalten wurden. Dann folgte für 10 s ein Wechsel in den CC-Zero-Modus (Strom auf 0 Ampere geklemmt). Dieses Protokoll wurde bis zum Ende des Experiments fortlaufend wiederholt. Dabei wurde ca. alle 2 min die Badlösung gewechselt. Zunächst bestand die Badlösung aus Kontrolllösung (Ringer), anschließend aus Ringer-Hochkalium 15 (15 mM K^+), dann aus Ringer-Hochkalium 50 (50 mM K^+). Die erhöhten K^+ -Konzentrationen bewirken größere Einwärtsströme und erlauben oft eine bessere Beurteilung der Einwärtsgerichtetheit des Kanals. Nachdem unter erneuter Gabe von Kontrolllösung das Erreichen des ursprünglichen

Membranpotentials abgewartet wurde, folgte die Gabe von 1 mM Bariumlösung (in Ringer). Barium ist ein kompetitiver Hemmstoff für Kaliumkanäle. Daher konnte der Anteil des Stromes, der unter Barium verschwand, als durch KCNJ10 bzw. KCNJ10/KCNJ16 verursacht betrachtet werden. Der Verlauf eines solchen Experiments ist in Abbildung 9 gezeigt.

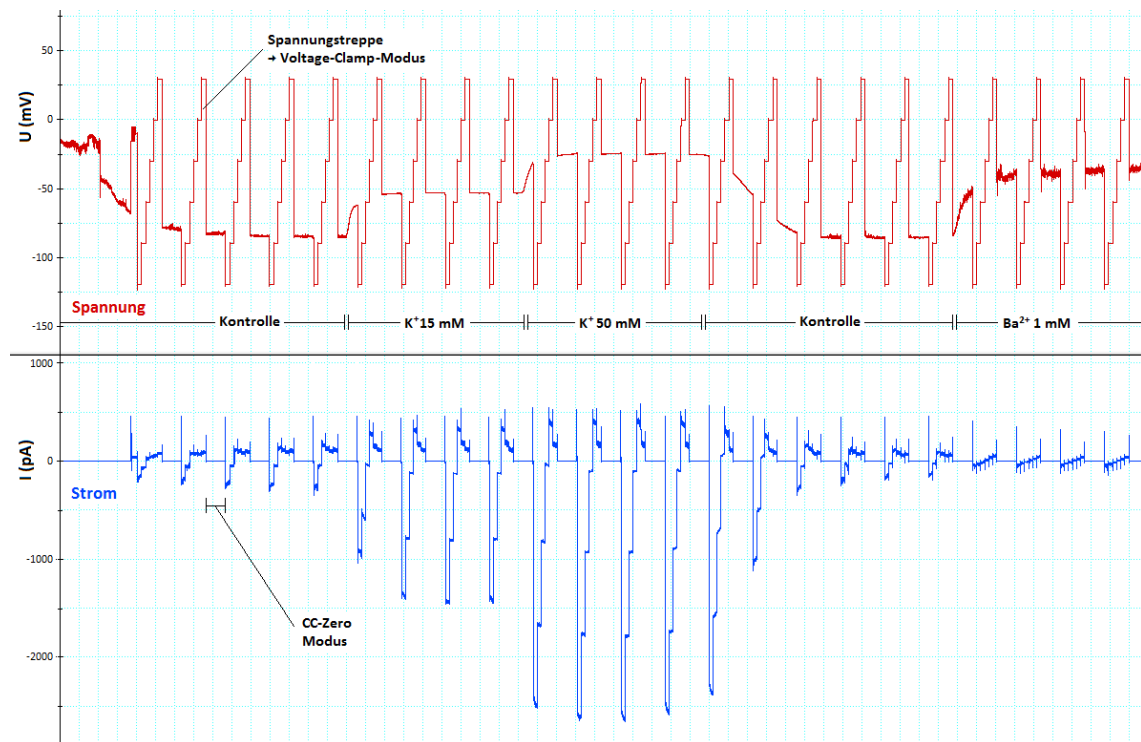


Abbildung 9: Beispielhaftes Ganzzellexperiment.

Ein Teil der Experimente mit KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren wurde mit veränderten Pipettenlösungen durchgeführt, um deren Einfluss auf die Kanalfunktion zu überprüfen. Dabei wurden folgende Varianten getestet:

1. Magnesium-freie Pipettenlösung
2. Pipettenlösung mit je 1,5 mM ADP und ATP (statt 3 mM ATP) und 3 mM Phosphat
3. Pipettenlösung mit je 1,5 mM ADP und ATP
4. Pipettenlösung mit 1,5 mM ATP

Des Weiteren wurde der Einfluss der Arzneistoffe Diazoxid und Tolbutamid auf die Funktion der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere getestet. Diazoxid ist ein Kaliumkanalöffner und Antihypoglykämikum, das unter anderem in der Therapie von Insulinomen zum Einsatz kommt. Tolbutamid ist ein Sulfonylharnstoff, also ein orales Antidiabetikum, das durch Bindung an die SUR1-Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle in β -Zellen des Pankreas diese Kanäle blockt. Beide Stoffe waren in einer Konzentration von 10 μ M in Ringer-Hochkalium 50 gelöst. Hier wurde im Protokoll auf die erneute Gabe von Kontrolllösung und die Hemmung durch Barium verzichtet.

Stattdessen wurde nach Ringer-Hochkalium 50 die Diazoxid-Lösung gegeben, dann wieder Ringer-Hochkalium 50 und zum Schluss die Tolbutamid-Lösung.

2.3.4 Einzelkanalmessungen

Für die Einzelkanalmessungen wurden HEK-Zellen verwendet, die mit KCNJ10/KCNJ16 ko-transfiziert waren. Die Experimente wurden im Cell-attached Modus durchgeführt, bei dem nach Bildung des Gigaseals der Membranfleck unter der Pipette auf unterschiedliche Spannungen geklemmt wird. Diese Konfiguration ist in Abbildung 8B dargestellt. In einem solchen Patch waren meist ein bis drei Kanalproteine enthalten. Weil die Experimente sehr inhomogen verliefen, konnte kein Protokoll etabliert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Ganzzelleableitungen

3.1.1 Ruhemembranpotential

Das Membranpotential von Zellen entsteht durch die ungleiche Verteilung verschiedener Ionen auf beiden Seiten der Zellmembran und durch die jeweilige Leitfähigkeit der Membran für diese Ionen. Da die transfizierten CHO-Zellen durch die hohe Expression von KCNJ10- bzw. KCNJ10/KCNJ16-Kanälen fast ausschließlich für K^+ leitfähig sein sollten, müsste ihr Ruhemembranpotential nahe dem Diffusionspotential von K^+ , also bei ca. -90 mV liegen. Ein depolarisiertes Membranpotential zeugt von einer verminderten Kaliumleitfähigkeit durch funktionell eingeschränkte Kanäle.

Das Membranpotential der Zellen wurde im CC-Zero-Modus der Patch-Clamp-Experimente unter Kontrolllösung (Ringer, also $[K^+] = 5$ mM) bestimmt. Bei den mit KCNJ10 Wildtyp transfizierten Zellen lag es bei $-81,96 (\pm 2,16)$ mV, bei den mit A167V transfizierten Zellen bei $-81,88 (\pm 1,86)$ mV. Die ko-transfizierten Zellen wiesen beim Wildtyp ein Membranpotential von $-81,72 (\pm 1,78)$ mV auf, bei den Zellen, die KCNJ10 A167V und KCNJ16 ko-exprimierten lag es jedoch nur bei $-44,07 (\pm 2,86)$ mV. Zusätzlich wurde das Membranpotential unter 1 mM Ba^{2+} in der Badlösung gemessen. Dieses kommt durch die endogenen Kanäle der CHO-Zellen zustande. Eine Änderung des Membranpotentials durch die Gabe von Barium weist darauf hin, dass das ursprüngliche Membranpotential zum Teil durch KCNJ-Kanäle bedingt war. Abbildung 10 fasst diese Ergebnisse zusammen.

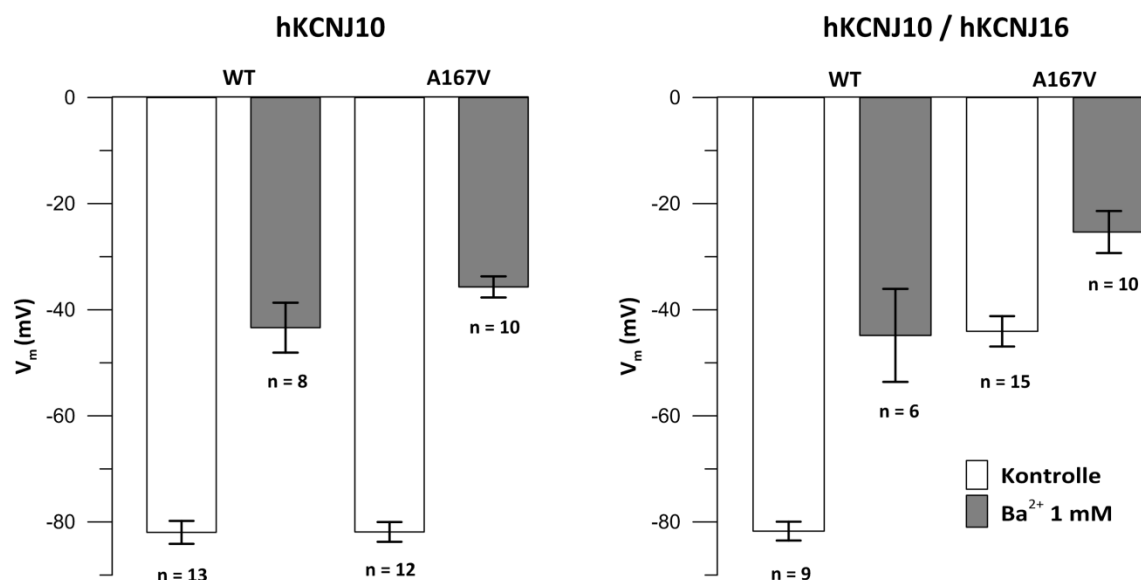


Abbildung 10: Ruhemembranpotentiale transfizierter CHO-Zellen.

3.1.2 Strom-Spannungs-Kurven bei homomerer Expression von KCNJ10

Strom-Spannungs-Kennlinien (oder auch U/I-Diagramme) beschreiben den Zusammenhang zwischen angelegter Klemmspannung und der gemessenen Stromantwort der Zelle. Ist dieser Zusammenhang vollkommen linear, dann bedeutet das, dass die Leitfähigkeit der Membran bei allen Spannungen gleich hoch ist und damit keinerlei Gleichrichtung vorliegt. Am Schnittpunkt mit der X-Achse lässt sich die Spannung ablesen, bei der kein Nettostrom fließen würde, was definitionsgemäß dem Ruhepotential entspricht.

Die gezeigten U/I-Diagramme (Abbildung 11) entstanden durch die Auswertung der während des Klemmprotokolls gemessenen Ströme. Dabei wurden jeweils die Ströme bei Kontrolllösung, Hochkalium 15, Hochkalium 50 und Barium in Ringer als eigene Kurven aufgetragen. Der Strom unter dem Einfluss von Barium entspricht im Wesentlichen dem Strom durch endogene Kanäle der Zelle

Bei den Zellen mit homomeren KCNJ10-Kanälen zeigte sich eine schwach ausgeprägte Einwärtsgleichrichtung. Bei einer Klemmspannung von -120 mV reduzierte die Mutante den Strom auf im Mittel 64 % des Stroms der Wildtyp-exprimierenden Zellen.

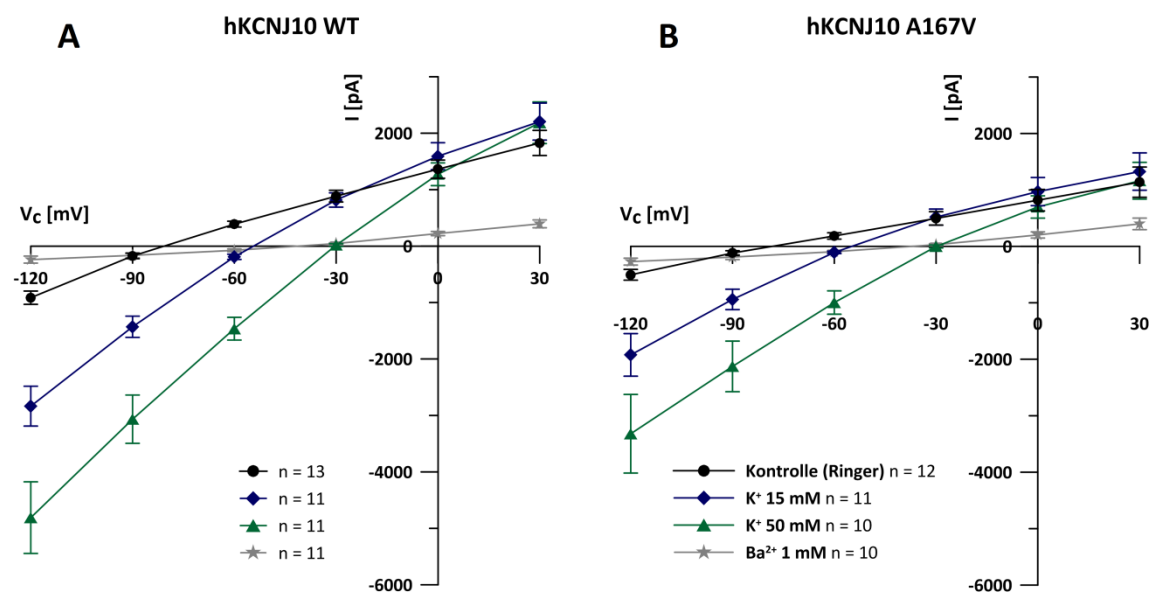


Abbildung 11: U/I-Diagramme bei homomerer Expression von KCNJ10.

3.1.3 Strom-Spannungs-Kurven bei Ko-Expression mit KCNJ16

Durch die Ko-Expression von Wildtyp-KCNJ10 mit KCNJ16 zeigten sich deutlich einwärtsgerichtete Ströme (siehe Abbildung 12A). Im Vergleich dazu waren die Ströme, die bei Ko-Expression der A167V-Mutante mit KCNJ16 gemessen wurden, merklich geringer (siehe Abbildung 12B). Der Stromfluss konnte zwar durch Verwendung von Hochkalium-Lösung erhöht werden, er bleibt aber dennoch deutlich unter Wildtyp-Niveau. Bei -120 mV betrug der Strom durch die A167V-Heteromere im Mittel 11 % des Wildtyp-Stroms, der bariumsensitive Strom sogar nur knapp über 1 %.

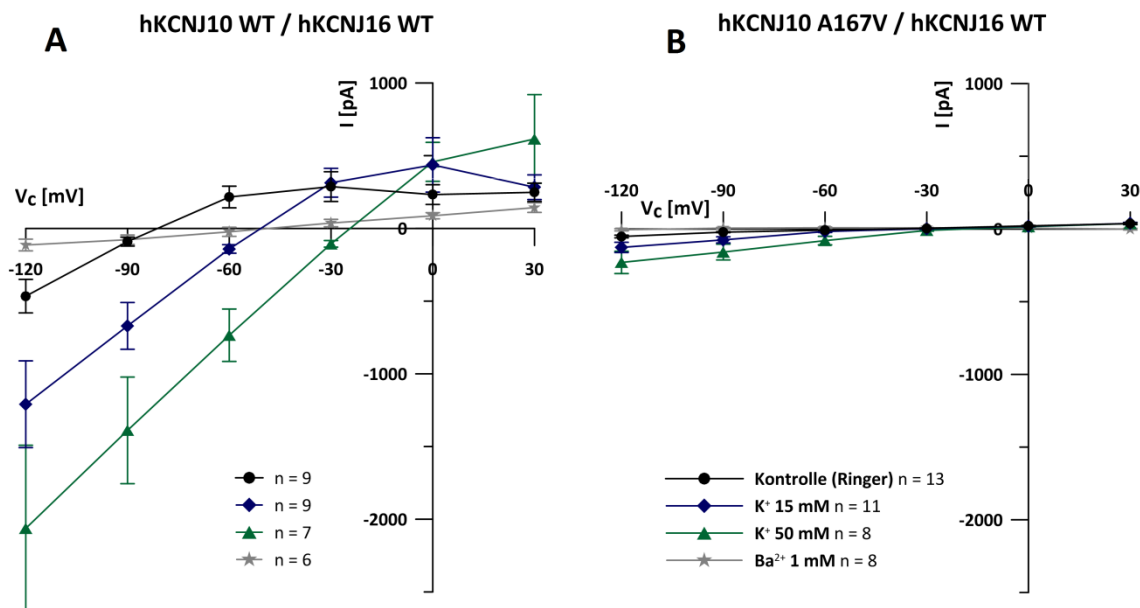


Abbildung 12: U/I-Diagramme bei heteromerer Expression mit KCNJ16.

3.1.4 Strom-Spannungs-Kurven bei veränderter Pipettenlösung

Diese Experimente wurden nur mit Zellen durchgeführt, die KCNJ10/KCNJ16-Heteromere exprimierten, denn in homomerer Expression hatte sich ein ohnehin nur geringerer Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp gezeigt. Um eine Aktivierung der KCNJ10 A167V/KCNJ16-Heteromere zu erreichen, wurden verschiedene Parameter der Pipettenlösung variiert.

Zuerst wurde eine Magnesium-freie Pipettenlösung verwendet. Dies lag nahe, da die Einwärtsgleichrichtung der KCNJ-Kanäle zu Teil durch Magnesium bedingt ist [18], Magnesium den Kanal also zumindest in der Auswärtsrichtung blockt. Abbildung 3 zeigt die Position des Mg^{2+} -Ions in der Kanalpore. Magnesium blockt den Kanal von intrazellulär, und die Pipettenlösung beeinflusst das intrazelluläre Milieu. Daher wäre bei einer Magnesium-freien Pipettenlösung zumindest ein Verlust der Einwärtsgleichrichtung und eventuell eine allgemeine Aktivierung des Kanals zu erwarten.

Bei Verwendung der Magnesium-freien Pipettenlösung konnte jedoch keine Verbesserung der Kanalfunktion bei den A167V-Heteromeren festgestellt werden. Deren Strom bei -120 mV lag im Mittel bei 14 % der mit Wildtyp transfizierten Zellen (siehe Abbildung 13B).

Es war, wenn überhaupt, nur ein geringer Verlust der Einwärtsgleichrichtung bei den Wildtyp-Heteromeren auszumachen (siehe Abbildung 13A).

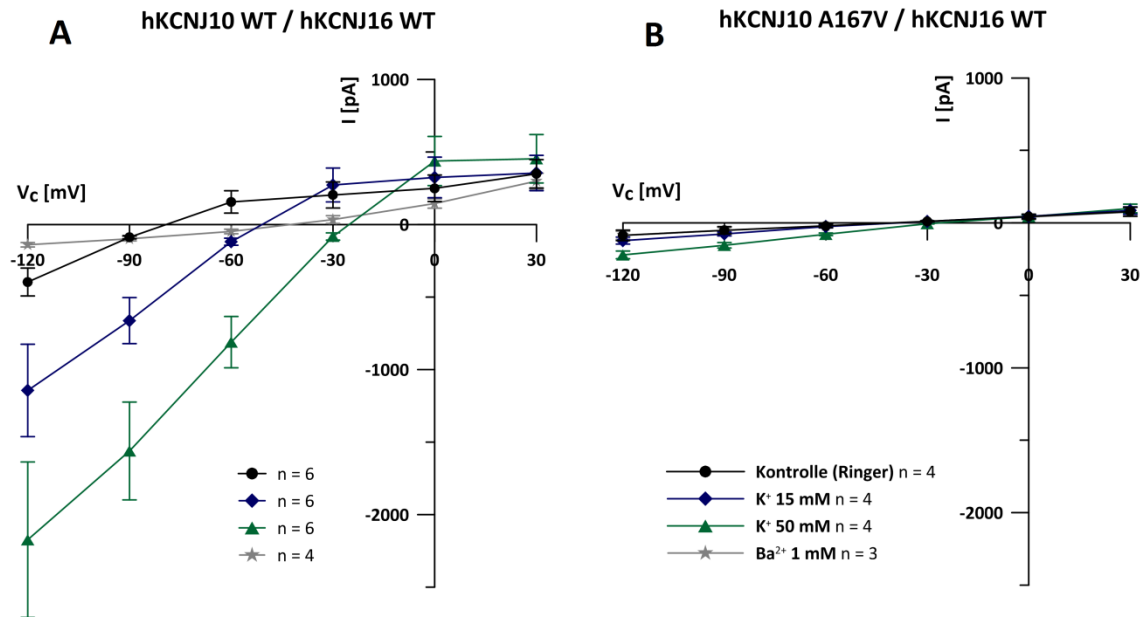


Abbildung 13: Ströme bei Magnesium-freier Pipettenlösung.

Als nächstes wurde versucht, in der Pipettenlösung den Zerfall von ATP zu ADP und Phosphat nachzuahmen. Dazu wurde die Hälfte des ATPs durch ADP ersetzt und zusätzlich 3 mM Phosphat eingesetzt. Hierunter nahm der Strom durch die A167V-Heteromere stark zu, sodass, wie aus Abbildung 14 hervorgeht, kaum mehr ein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp auszumachen war.

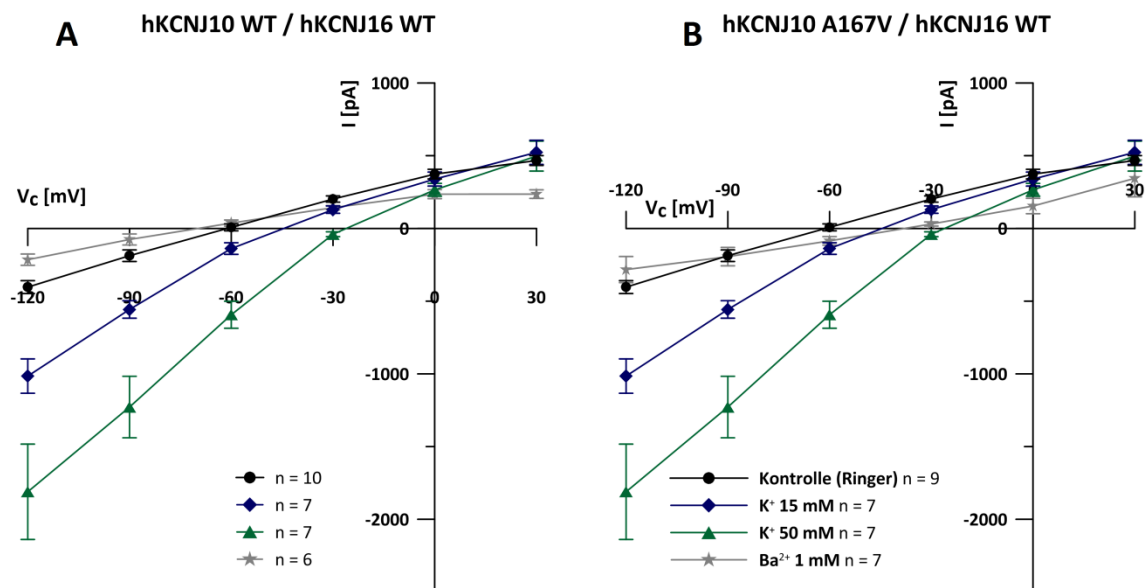


Abbildung 14: Ströme bei Pipettenlösung mit je 1,5 mM ATP und ADP und zusätzlich 3 mM Phosphat.

Um Herauszufinden, ob diese Aktivierung allein durch die Änderungen der ATP- bzw. ADP-Konzentration zustande kam, oder ob das zusätzliche Phosphat auch eine Rolle spielt, wurden im darauf folgenden Versuch wieder je 1,5 mM ATP und ADP eingesetzt, das zusätzliche Phosphat aber weggelassen. Auch hier sah man die Aktivierung der Mutante im Vergleich zu ihren Strömen unter Verwendung der normalen Pipettenlösung (siehe Abbildung 15B).

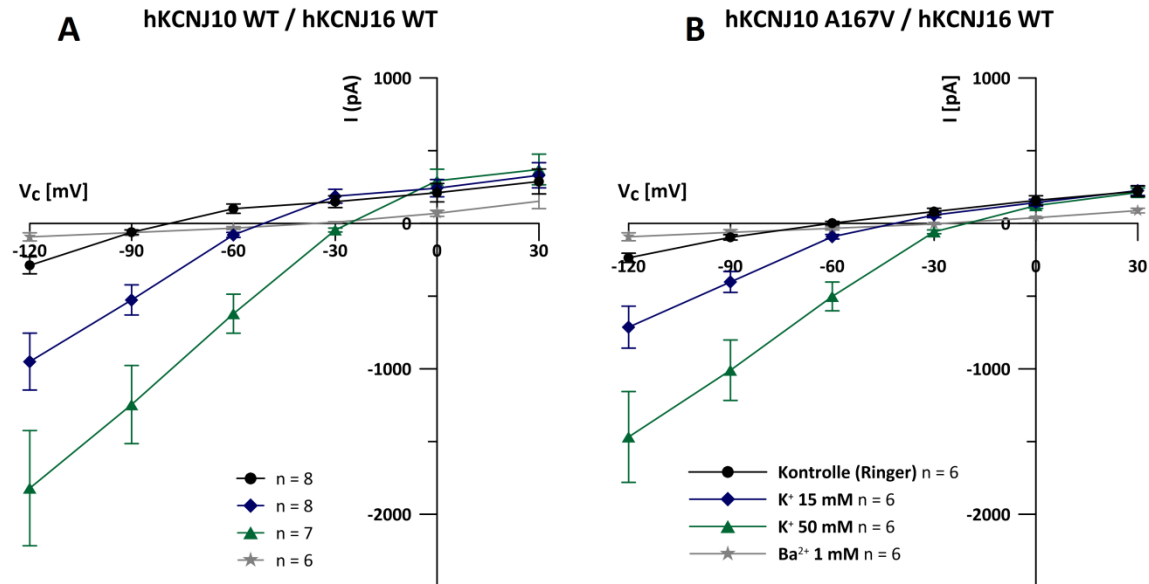


Abbildung 15: Ströme bei Pipettenlösung mit je 1,5 mM ATP und ADP.

Zur Klärung der Frage, ob denn nun das Verhältnis von ADP zu ATP eine Rolle für die beobachtete Funktionsverbesserung spielte, oder ob einzig die Reduktion von ATP um die Hälfte ausschlaggebend war, wurde abschließend eine Pipettenlösung mit 1,5 mM ATP verwendet. Wie Abbildung 16B zeigt, waren hierbei die durch die mutierten A167V-Heteromere verursachten Ströme wieder sehr gering.

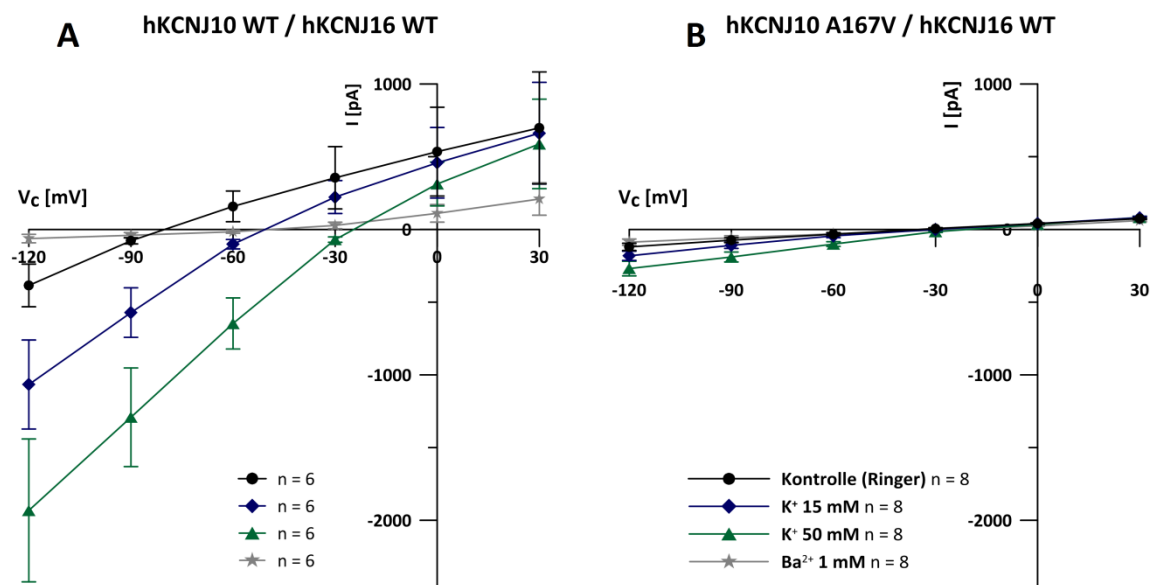


Abbildung 16: Ströme bei Pipettenlösung mit 1,5 mM ATP.

3.2 Pharmakologie

Die beobachtete Aktivierung der A167V-Heteromere durch ADP legte die Möglichkeit der pharmakologischen Aktivierung nahe. Daher wurde die Auswirkung des Kaliumkanalöffners Diazoxid und die des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid auf die Ganzzellströme bei heteromerer Expression von KCNJ10/KCNJ16 getestet. Die Wirkstoffe wurden in einer Konzentration von 10 μM appliziert. Gelöst wurden sie in Hochkalium 50, da hierrunter die Ströme am stärksten sind und man deshalb am ehesten einen Effekt sehen würde. Wie Abbildung 17 zeigt, konnte bei keiner der beiden getesteten Substanzen eine signifikante Veränderung der Ströme festgestellt werden.

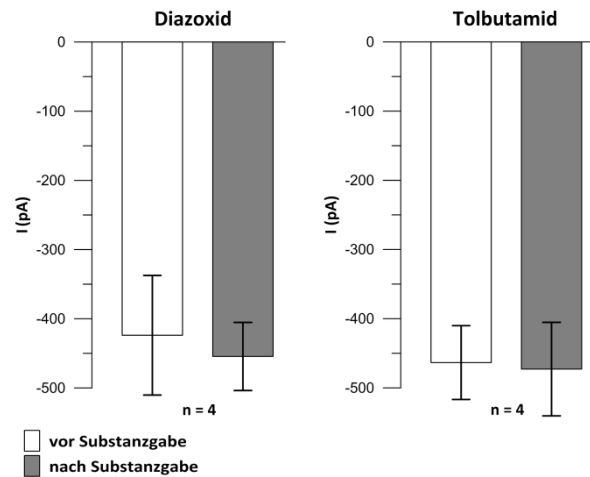


Abbildung 17: Ganzzellströme vor und nach Gabe von Diazoxid bzw. Tolbutamid bei 50 mM K^+ und einer Klemmspannung von -120 mV.

3.3 Einzelkanalmessungen

Die in den Ganzzellexperimenten gesehene Verminderung des Stroms durch die Mutante kann entweder durch eine verringerte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle oder aber durch einen geringeren Leitwert des Kanals zustande kommen. Welches von beiden zugrunde liegt, kann durch Einzelkanalmessungen geklärt werden.

Zunächst wurde versucht, die Kanäle in der Inside-out-Konfiguration zu vermessen. Hierbei wird aus der Cell-attached-Konfiguration heraus die Pipette schnell nach oben von der Zelle wegbewegt, und so der sich darunter befindliche Membranfleck herausgerissen (exzidiierter Patch). Die Innenseite der Membran zeigt nun ins Bad, die Außenseite zur Pipette. Die Inside-out-Konfiguration hat den Vorteil, dass man die zytosolischen Bedingungen rasch ändern kann und so beispielsweise die Bariumhemmbarkeit und die pH-Abhängigkeit der Kanäle gut untersuchen kann.

Bedauerlicherweise zeigte sich in diesen Versuchen ein erheblicher „Run-Down“ der Kanalaktivität. Das heißt, dass kurz nach Bildung des exzidierten Patches bereits keine Kanalereignisse mehr detektierbar waren. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 18.

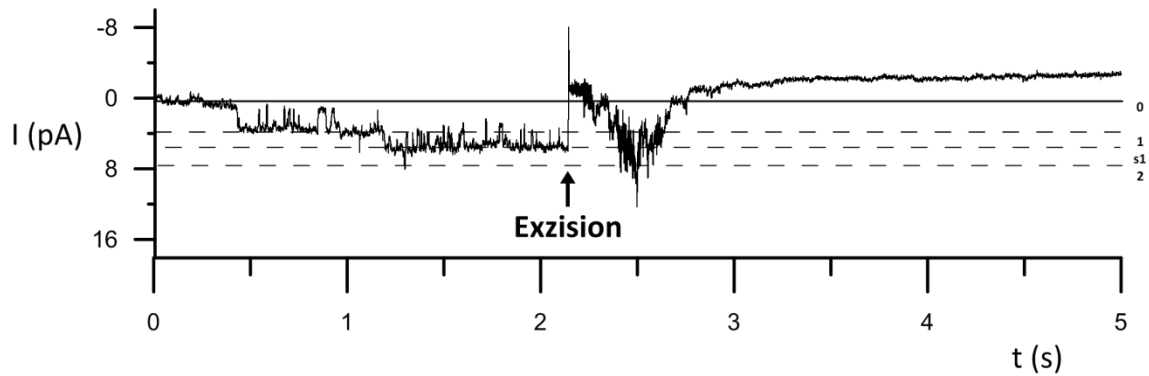


Abbildung 18: „Run-Down“ nach Bildung der Inside-Out Konfiguration.

Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass im Zytosol Faktoren vorliegen, die die Kanäle für ihre Funktion benötigen. Um die Kanäle wieder zu aktivieren, wurde die Badlösung durch Pipettenlösung einschließlich ATP ersetzt, was aber auch nicht zum Erfolg führte.

Um trotzdem Experimente durchführen zu können, wurde in der Cell-attached-Konfiguration weitergearbeitet. Diese Konfiguration hat den Vorteil, dass die zytosolische Seite unverändert bleibt und die Kanäle so in ihrer natürlichen Umgebung arbeiten können. Der Nachteil ist, dass man pH-Abhängigkeit und Bariumhemmbarkeit nur schlecht untersuchen kann. Ein Beispiel für eine Cell-attached-Messung zeigt Abbildung 19. Hier sind mehrere Kanäle im Membranfleck unter der Pipette enthalten.

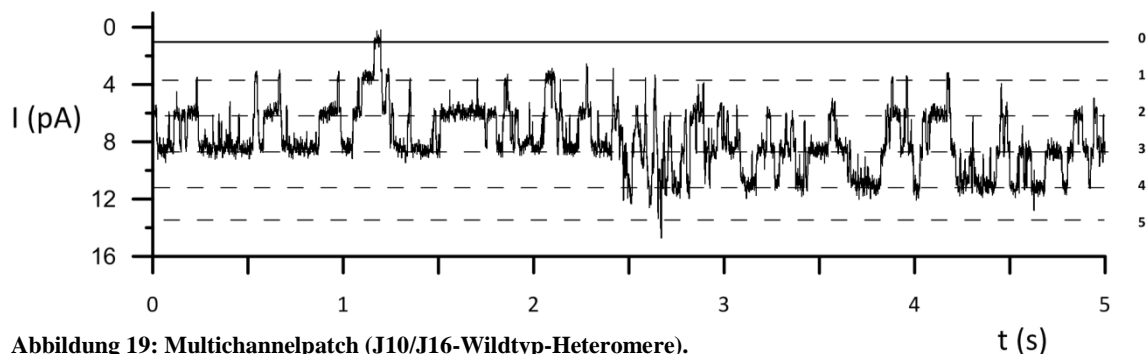


Abbildung 19: Multichannelpatch (J10/J16-Wildtyp-Heteromere).

Allerdings waren auch diese Messungen nicht unproblematisch: Zwar war immer wieder deutliche Kanalaktivität vorhanden (sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante), streckenweise fehlte sie dann aber wieder völlig. Aus diesem Grund ließen sich keine Absolutwerte für die Offenwahrscheinlichkeit ermitteln. Man kann lediglich sagen, dass die Offenwahrscheinlichkeit bei den mutierten Kanälen im Vergleich zu den Wildtypkanälen tendenziell verringert schien. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen typische Aufzeichnungen der Kanalaktivität von Wildtyp und Mutante, die mutmaßen lassen, dass die Offenwahrscheinlichkeit bei der Mutante verringert ist.

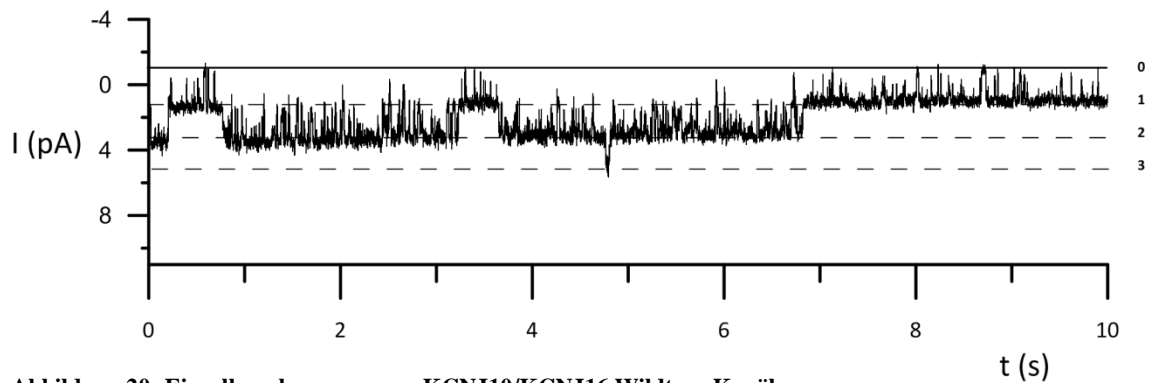


Abbildung 20: Einzelkanalmessung von KCNJ10/KCNJ16 Wildtyp- Kanälen.

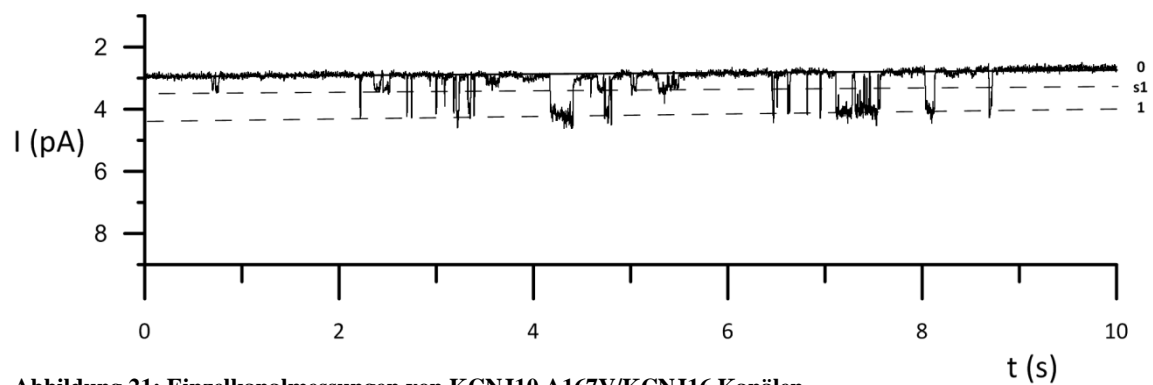


Abbildung 21: Einzelkanalmessungen von KCNJ10 A167V/KCNJ16 Kanälen.

Bei den Wildtyp-Kanälen (Abbildung 19) ist immer mindestens ein Kanal geöffnet (1), häufig auch zwei (2) oder sogar drei (3). Bei den A167V-Heteromeren ist, wenn überhaupt, nur ein einziger Kanal geöffnet. Gelegentlich lässt sich hier eine geringere Amplitude beobachten (s1), was vermutlich ein sogenanntes „sub-state“ ist (siehe Abschnitt 1.3.3).

Solche sub-states weisen die Wildtyp-Kanäle natürlich auch auf, in einer Darstellung wie Abbildung 19 lassen sie sich aber durch die häufigen Öffnungs- und Schließereignisse nur schwer ausmachen. Bei einer höheren Auflösung sind sie deutlich besser zu erkennen, wie Abbildung 22 zeigt.

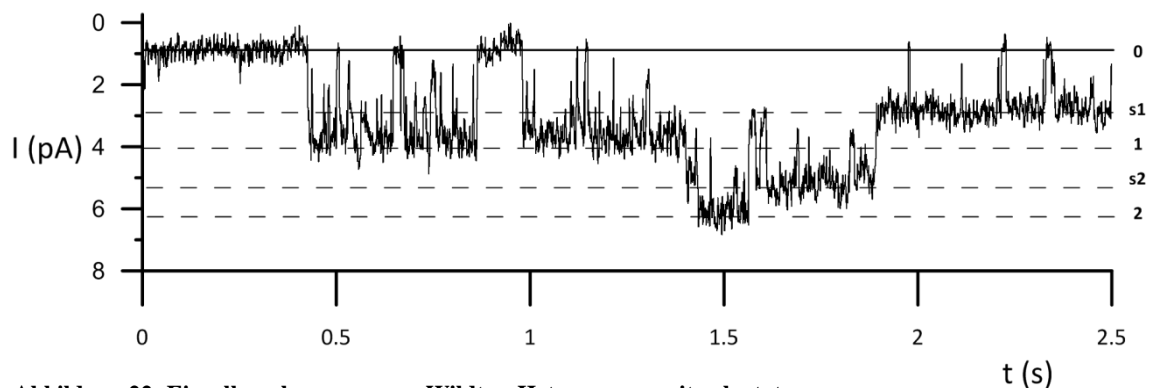


Abbildung 22: Einzelkanalmessung von Wildtyp-Heteromeren mit sub-states.

Um zu sehen, ob die A167V-Heteromere nur in Ihrer Offenwahrscheinlichkeit eingeschränkt sind, oder ob auch der Strom, der bei Kanalöffnung durch sie fließen kann, reduziert ist, vergleicht man den Leitwert (*elektrischer Leitwert* $G = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{\Delta U}$) des mutierten Kanals mit dem des Wildtyps. Bei den Wildtyp-Kanälen betrug er 43,8 ($\pm 4,8$) pS, bei den mutierten Kanälen waren es 42,7 ($\pm 3,9$) pS (in beiden Fällen n = 6). Somit unterschieden sich die mutierten Heteromere in ihrem Leitwert nicht von den Wildtyp-Kanälen.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von KCNJ10

Der Kaliumkanal KCNJ10 ist für die Funktion von ZNS, Niere und Innenohr essentiell [3]. Im ZNS, v.a. im Kleinhirn und in der Retina, ist er in Gliazellen exprimiert. Dort trägt er dazu bei, die durch neuronale Aktivität steigende extrazelluläre K^+ -Konzentration durch Aufnahme von K^+ -Ionen in die Astrozyten wieder auszugleichen („ K^+ -spatial-buffering“) [26]. Im Innenohr ist KCNJ10 für die Sekretion von K^+ -Ionen in die Endolymphe zuständig, und damit an der Erzeugung des endokochleären Potentials beteiligt [24]. Besonders wichtig ist er aber für die Funktion des distalen Tubulus der Niere. Hier erlaubt er den basolateralen Ausstrom von K^+ -Ionen, damit diese der Na^+/K^+ -ATPase zur Verfügung stehen können („pump-leak-coupling“). Die extrazelluläre K^+ -Konzentration ist für Arbeit der Na^+/K^+ -ATPase limitierend, und ohne deren regelrechte Funktion kommen die meisten Transportprozesse im distalen Tubulus zum Erliegen [3]. In der Niere kommt KCNJ10 zusammen mit KCNJ16, einem verwandten Kanalprotein, vor. Zusammen bilden sie ein Heterotetramer, dessen Eigenschaften sich von denen des KCNJ10-Homomers unterscheiden [27]. Diese Heterotetramere bilden die entscheidenden basolateralen Kaliumkanäle im distalen Tubulus [5] und Sammelrohr [6] der Maus. Die in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse heben die Bedeutung der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere auch beim Menschen hervor. Für die basolaterale Kaliumleitfähigkeit und damit für die gesamte Funktion des distalen Tubulus sind diese heteromere unentbehrlich.

4.2 Geringer Funktionsverlust von KCNJ10 A167V-Homomeren

Bislang wurden die Symptome, die beim EAST/SeSAME-Syndrom auftreten, vor allem auf die Fehlfunktion von homomeren KCNJ10-Kanälen zurückgeführt [3,8,9]. Im letzten Jahr wurde jedoch eine Gruppe von Patienten beschreiben, die am EAST-Syndrom leiden und in der KCNJ10-Untereinheit die homozygote Mutation A167V aufweisen [13], eine Mutation mit immerhin $\frac{2}{3}$ Restfunktion in homomerer Expression [13,15,16]. Diese Mutante wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

In den Ganzzellexperimenten zur Funktion von KCNJ10-Homomeren konnte die in der Literatur beschriebene leichte Einschränkung der Funktionalität, die durch die A167V-Mutation ausgelöst wird, bestätigt werden. Das Membranpotential der mit KCNJ10 A167V transfizierten Zellen unterschied sich nicht von dem der mit KCNJ10 Wildtyp transfizierten Zellen. Die

Ganzzellströme wurden durch die Mutation auf im Mittel 64 % der Ströme von Wildtyp-exprimierenden Zellen reduziert. Das deckt sich mit den Erkenntnissen von Sala-Rabanal *et al.*, Williams *et al.* und Parrock *et al.*, die Restfunktionen im Bereich von 60-70 % in Bezug auf den Wildtyp beschrieben [13,15,16] (siehe Tabelle 1). Lediglich Tang *et al.* hatten einen kompletten Funktionsverlust (weniger als 10 % Restfunktion) dieser Mutation in HEK-Zellen beobachtet [14].

Heterozygote Träger von KCNJ10-Mutationen, wie etwa die Eltern betroffener Patienten, sind asymptomatisch [8,9]. Da bei ihnen das Genprodukt eines Allels ausfällt, müssten sie eine Funktionseinschränkung von etwa 50 % haben. Deshalb ist es fraglich, wie die A167V-Mutation mit ihrer Restfunktion von ca. 60 % einen Phänotyp verursachen kann.

4.3 KCNJ10/KCNJ16-Heteromere für Nierenphänotyp pathogenetisch

Bei Untersuchung der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere fiel auf, dass durch die A167V-Mutation eine deutliche Funktionseinschränkung verursacht wird. Die Zellen wiesen ein depolarisiertes Ruhemembranpotential auf (ca. -45 mV; bei den mit Wildtyp-Heteromeren transfizierten Zellen ca. -80 mV). Zudem war der Stromfluss stark vermindert: Er betrug nur ca. 11 % der Wildtyp-Ströme (siehe Abschnitt 3.1.3). Parrock *et al.* fanden in Oozyten sogar eine Reduktion des Stromflusses auf nur 2 % im Vergleich zum Strom bei Expression von Wildtyp-Heteromeren [13].

Eine solche Diskrepanz zwischen der Funktionalität von KCNJ10-Homomeren und KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren ist für keine der anderen bekannten Mutationen beschrieben [15]. Dort sind sowohl KCNJ10-Homomere als auch KCNJ10/KCNJ16-Heteromere mehr oder weniger gleichermaßen beeinträchtigt [15]. Lediglich für die Mutation R65P beschrieben Williams *et al.* eine ähnliche Differenz. Diese ist aber mit 13 % Restfunktion beim Heteromer im Vergleich zu 23 % bei homomerer Expression nicht so stark ausgeprägt wie bei A167V.

Die Tatsache, dass A167V krankheitsverursachend ist, bietet neue Einblicke in das Pathogenitätsmodell des EAST-Syndroms: Die Patienten mit der A167V-Mutation leiden vor allem an hypokaliämischer Alkalose, Hypomagnesiämie, Innenohrschwerhörigkeit und Ataxie. Krampfanfälle sind nur bei einem der drei Patienten beobachtet worden [13]. KCNJ10/KCNJ16-Heteromere kommen wahrscheinlich im distalen Tubulus der Niere vor [5,6]. Die ausgeprägte Nierensymptomatik der A167V-homozygoten Patienten legt nahe, dass KCNJ10/KCNJ16-Heteromere im distalen Tubulus dominieren, und dass KCNJ10-Homomere für die basolaterale Kaliumleitfähigkeit eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Die möglichen Gründe, warum die A167V-Heteromere reduzierte Ströme liefern, sind vielfältig. Am wahrscheinlichsten ist eine gestörte Interaktion mit KCNJ16. Für die Interaktion mit KCNJ16 ist vor allem (aber nicht ausschließlich) die zweite Transmembrandomäne von KCNJ10 von Bedeutung [28]. Diese umfasst die Aminosäuren 143 bis 164, und befindet sich damit in direkter Nachbarschaft zur Mutation A167V (siehe Abbildung 4).

Eine Störung in der Interaktion könnte zu dem führen, dass KCNJ10 und KCNJ16 gar nicht assoziieren. In diesem Fall würde man nur KCNJ10-Homomere finden. Die Menge an eingesetztem KCNJ10-Plasmid in den Versuchen mit Heteromeren betrug nur ein Zehntel der Plasmidmenge in den Versuchen mit KCNJ10-Homomeren. Daher wäre in diesem Fall zu erwarten, dass die Ströme ca. ein Zehntel der Ströme aus den A167V-Homomer-Experimenten betragen. In dieser Arbeit betrug der Strom bei heteromerer Expression etwa 25 % des Stroms, der bei den Zellen mit KCNJ10 A167V-Homomerem gemessen wurde, was gegen diese Annahme spricht, sie jedoch aufgrund der Variabilität der Expressionsstärke nicht widerlegt. Hinzu kommt aber noch, dass in den Einzelkanalmessungen der KCNJ10 A167V/KCNJ16-Heteromere eindeutige sub-states zu beobachten, die bei ausschließlicher Bildung von KCNJ10-Homomeren nicht vorkommen dürfen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass es zwar zur Bildung von KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren kommt, diese aber aufgrund der Mutation nicht in die Membran gelangen können. Dies ist, in homomerer Expression, beispielsweise bei der KCNJ10-Nonsense-Mutation R199X der Fall, bei der durch ein vorzeitiges Stopp-Codon der Carboxy-Terminus verkürzt ist. Hierdurch geht eine PDZ-Bindestelle verloren, die für die Expression in der Zellmembran unentbehrlich ist [15]. Für A167V-Homomere ist eine leicht reduzierte Oberflächenexpression beschrieben [14–16]. Möglicherweise wird diese Problematik durch die Heteromerisation mit KCNJ16 verstärkt, sodass nur eine geringe Anzahl von Kanälen bis in die Membran gelangt. Das kann nicht ausgeschlossen werden, da in den Einzelkanalmessungen bei der Mutante selten mehr als ein Kanal im Membranfleck enthalten zu sein schien. Dieser Befund ließe sich aber auch dadurch erklären, dass zwar meist mehr als ein Kanal vorhanden war, die Kanäle aber so selten aktiv waren (geringe Offenwahrscheinlichkeit), dass sich ihre Öffnungsereignisse nicht überlagerten.

Am ehesten ist anzunehmen, dass die Heteromere zwar in die Membran gelangen, aber dort nicht richtig funktionieren können. Dafür spricht, dass in den Einzelkanalmessungen immer wieder deutliche Kanalereignisse mit für KCNJ10/KCNJ16-Heteromere typischen sub-states zu beobachten waren. Hier zeigte sich ein für die heteromeren A167V-Kanäle normaler Leitwert. Daher ist eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit die naheliegendste Ursache für die eingeschränkte Funktion. Die Offenwahrscheinlichkeit kann durchgehend herabgesetzt sein,

oder aber durch eine veränderte Regulation bedingt sein, die zu einer deutlichen Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit unter physiologischen Bedingungen führt.

Ein Beispiel für eine veränderte Regulation sind die Homomere der KCNJ10-Mutanten R65P und R175Q. Bei ihnen ist das pH-Optimum so weit in den alkalischen Bereich verschoben, dass sie bei physiologischem pH kaum aktiv sind [10]. Für A167V-Homomere finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben: Sala-Rabanal *et al.* konnten für A167V keinen solchen pH-Shift feststellen [15], Williams *et al.* hingegen schon [16]. Da eine Heteromerisation mit KCNJ16 die pH-Sensitivität deutlich erhöht [27], wäre eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit der KCNJ10 A167V/KCNJ16-Heteromere sehr interessant gewesen. Da sich aber bei der Bildung exzidierter Patches ein erheblicher Run-Down zeigte, konnten die geplanten Messungen zur pH-Abhängigkeit nicht durchgeführt werden.

Was hingegen beobachtet werden konnte, war eine Verbesserung der Kanalfunktion durch eine ADP-haltige Pipettenlösung. Das weist darauf hin, dass die Offenwahrscheinlichkeit der A167V-Heteromere nicht durchgehend herabgesetzt ist, sondern dass sie durch Einflüsse wie diese veränderte Pipettenlösung erhöht werden kann. Auf die Hintergründe und die denkbaren Mechanismen wird in Abschnitt 4.5 eingegangen.

Eine andere Theorie wird von Tanemoto *et al.* (2014) vorgeschlagen. Sie sehen das Hauptproblem nicht in eingeschränkt funktionsfähigen KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren, sondern in einer gestörten Oberflächenexpression von KCNJ10 A167V-Homomeren. Die beispielsweise von Tang *et al.* (2010) nachgewiesene Oberflächenexpression von KCNJ10 A167V Homomeren in HEK-Zellen sei ein Artefakt, das durch die Verwendung eines ungeeigneten Expressionssystems entstehe. Die Polarität der Tubuluszellen (apikal und basolateral) mache es notwendig, dass gebildete Membranproteine zur richtigen Seite, im Fall von KCNJ10 nach basolateral, transportiert werden. Die Pathogenität der A167V-Mutation kommt laut dieser Theorie dadurch zustande, dass das veränderte Protein nicht in der Lage ist, ordnungsgemäß mit den Proteinen, die den Transport zur richtigen Seite bewirken, zu interagieren. In CHO- oder HEK-Zellen, die nicht tubulären Ursprungs sind, gelange KCNJ10 A167V hingegen problemlos zur Oberfläche [17].

In ihren Experimenten verwendeten Tanemoto *et al.* die polarisierten MDCKII-Zellen und konnten zeigen, dass KCNJ10 und KCNJ16 sich dort basolateral anhäufen. Außerdem fanden sie heraus, dass die KCNJ10-Untereinheit mit dem Gerüstprotein MAGI-1 ko-präzipitiert, KCNJ16 hingegen nicht. Daraus schlossen Tanemoto *et al.*, dass KCNJ10 *in vivo* in irgendeiner Weise mit dem basolateral fixierten MAGI-1 interagiert. Sie wiesen nach, dass die A167V-Mutante in MDCKII-Zellen nicht mit MAGI-1 interagiert, in HEK-Zellen hingegen genau so

gut wie der Wildtyp. Daraus schlussfolgerten sie, dass die verminderte Oberflächenexpression in polarisierten Zellen nicht direkt durch eine gestörte Interaktion mit MAGI-1 zustande kommt, sondern durch einen ineffizienten Transport von KCNJ10 A167V zu MAGI-1. Da diese Transportmechanismen für Membranproteine von Geweben zu Gewebe unterschiedlich seien, liefere das auch die Erklärung dafür, warum bei den A167V-homozygoten EAST-Patienten vor allem Niere und Innenohr betroffen sind, Krampfanfälle aber weniger stark im Vordergrund stehen [17].

Es ist denkbar, dass sowohl dieser Mechanismus als auch die eingeschränkt funktionsfähigen KCNJ10/KCNJ16-Heteromere für den Phänotyp der A167V-Mutation von Bedeutung sind.

4.4 Einfluss von ADP auf die Funktion heteromerer A167V Kanäle

KCNJ10/KCNJ16-Heteromere der Mutante A167V konnten durch die Verwendung einer Pipettenlösung, bei der die Hälfte des ATPs durch ADP ersetzt worden war, aktiviert werden. Hierbei war die Anwesenheit von ADP bzw. das Mengenverhältnis von ADP zu ATP entscheidend, nicht die Reduktion des ATP-Gehalts.

Die Aktivierung des mutierten KCNJ10/KCNJ16-Kanals durch ADP erinnert an die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in β -Zellen des Pankreas durch eine steigende ADP:ATP-Ratio. Die pankreatischen K_{ATP} -Kanäle entstehen durch Assoziation von 4 KCNJ11 ($K_{ir} 6.2$) - Untereinheiten mit 4 Sulfonylharnstoffrezeptor 1 (SUR1) -Untereinheiten. Hierbei bilden die KCNJ-Anteile die Kanalpore, während die Sulfonylharnstoffrezeptoren die regulatorische Einheit des Kanals darstellen (siehe Abbildung 23). Sulfonylharnstoffrezeptoren gehören zur Superfamilie der ATP-binding-cassette-Proteine (ABC-Transporter), einer Gruppe von Transmembranproteinen, die ATP binden und hydrolysieren können.

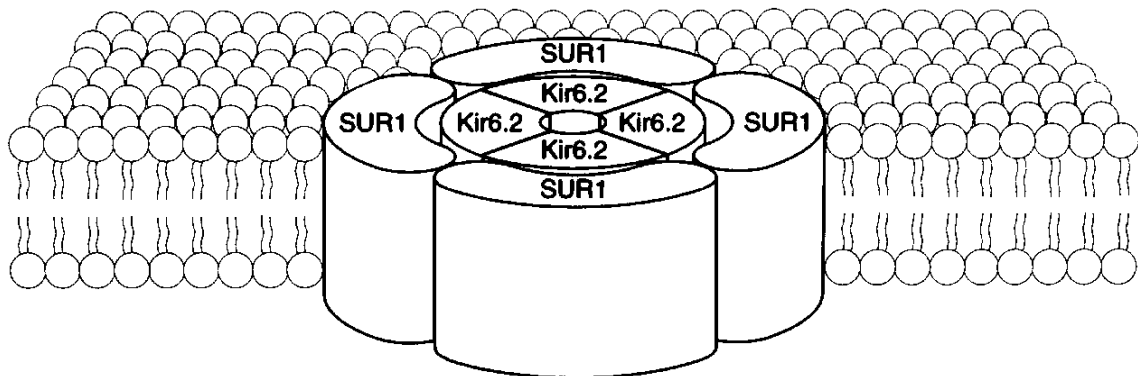


Abbildung 23: Aufbau des pankreatischen K_{ATP} -Kanals. Entnommen aus Seino 1999 [31].

Liegt ein hoher Glukose-Spiegel im Blut vor, so steigt das ATP:ADP-Verhältnis in der Zelle und die K_{ATP} -Kanäle werden blockiert. Dadurch depolarisiert die Zelle, was die Öffnung

spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bewirkt. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen löst die Freisetzung von Insulin aus Speichervesikeln aus. Bei Hypoglykämie hingegen liegt in der Zelle mehr ADP vor, was den Kanal aktiviert, die Zelle hyperpolarisiert und eine Insulinfreisetzung verhindert [1]. Die gleiche Wirkung kann auch durch den K^+ -Kanal-Öffner Diazoxid erzielt werden. Das Antidiabetikum Glibenclamid hingegen hemmt diesen Kanal und führt damit zur Exozytose der Insulin-Speichervesikel, wie es physiologischerweise ein hoher Glukose-Spiegel bewirken würde [31]. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 24 gezeigt. Als Ort der ADP-Wirkung (und auch der Wirkung von Diazoxid) wird das Walker-A-Motiv in der Nukleotid-bindenden Domäne von SUR1 angenommen, da die Regulation durch die genannten Stoffe durch Mutationen an dieser Stelle verloren geht [32].

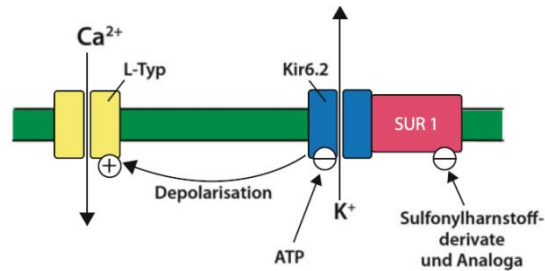


Abbildung 24: Funktion ATP-abhängiger K^+ -Kanäle.
Entnommen aus Freissmuth, Offermanns, Böhm 2012 [37].

Analog aufgebaute K_{ATP} -Kanäle kommen auch im Herz- und Skelettmuskel sowie in der glatten Muskulatur von Gefäßwänden vor. Im kardialen K_{ATP} -Kanal (in Herz- und Skelettmuskel) kommt als porenbildender Teil ebenfalls KCNJ11 vor, als Sulfonlharnstoffrezeptor aber SUR2A, eine der Splicevarianten des niedrig-affinen Sulfonlharnstoffrezeptors SUR2. Der kardiale K_{ATP} -Kanal wird erst bei deutlich höheren Konzentrationen von Glibenclamid gehemmt und überhaupt nicht durch Diazoxid stimuliert, dafür aber durch andere K^+ -Kanalöffner wie Pinacidil und Cromakalim [31].

Die kardialen K_{ATP} -Kanäle öffnen sich beispielsweise bei Ischämie des Herzmuskels oder unter dem Einfluss von Adrenalin. Ihre Öffnung bewirkt eine schnellere Repolarisation, also eine Verkürzung des Aktionspotentials und damit auch eine Verkürzung der Kontraktionsdauer. Hierdurch wird der Herzmuskel vor Überlastung geschützt, da sein ATP- und somit auch sein O_2 -Verbrauch sinkt, während die O_2 -Versorgung durch die verlängerte Diastole verbessert wird [33].

Der K_{ATP} -Kanal in der glatten Muskulatur der Gefäßwände besteht aus KCNJ8 (Kir 6.1 oder $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$, 70 % homolog zu KCNJ11) und SUR2B, der anderen Splicevariante von SUR2. Er setzt den Gefäßtonus herab, indem er bei Hyperkapnie, Azidose und durch ADP (bzw. auch durch UDP und GDP), geöffnet wird. Im Gegenzug wird er durch eine hohe Konzentration von ATP gehemmt, was den Gefäßtonus erhöht. Außerdem wird dieser K_{ATP} -Kanal über vasoaktive Substanzen reguliert: Vasopressoren wie z.B. α_1 -Agonisten hemmen den Kanal über die Proteinkinase C, Vasodilatoren wie VIP oder β_2 -Agonisten wirken über die Proteinkinase A stimulierend [34].

Interessanterweise wurde bei alleiniger Expression von KCNJ8 in HEK-Zellen (also ohne SUR) eine ATP-abhängigkeit festgestellt, aber keine Reaktion auf Diazoxid oder Sulfonylharnstoffe. Bei *Xenopus* Oozyten und COS-Zellen war das aber nicht der Fall. Das wird dadurch begründet, dass der für die ATP-Abhängigkeit benötigte Sulfonylharnstoffrezeptor endogen in HEK-Zellen exprimiert werden könnte [31]. Ähnlich ließe sich auch das Verhalten der KCNJ10 A167V/KCNJ16-Heteromere in CHO-Zellen in den hier beschriebenen Versuchen deuten. Hier wurde zwar eine ATP:ADP-Abhängigkeit, aber ebenfalls keine pharmakologische Beeinflussbarkeit gefunden.

SUR2B wird in vielen Geweben exprimiert [31]. Unter anderem wurde es in Tubuluszellen von Ratten nachgewiesen, wo er vermutlich renale K_{ATP} -Kanäle mit KCNJ1 (ROMK) bildet [35]. Eine Expression im menschlichen Tubulus scheint daher ebenfalls möglich. Neben einer Assoziation mit ROMK wäre ebenso eine Assoziation mit KCNJ10 bzw. KCNJ10/KCNJ16 denkbar.

Bemerkenswert ist, dass die beschriebene Aktivierung durch ADP nur bei der Mutante, aber nicht beim Wildtyp beobachtet werden konnte. Bei den Wildtyp-Heteromeren ließ sich bloß eine leichte Reduktion der Einwärtsgerichtung beobachten. Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch die A167V-Mutation eine Verstärkung der Regulation über Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten auftritt bzw. dass die Möglichkeit der Assoziation mit SUR-Proteinen durch die Mutation erst möglich wird. Vielleicht war die „Aktivierung“ der Wildtyp-Kanäle über den gleichen Mechanismus zwar vorhanden, brachte aber bei der ohnehin schon großen Offenwahrscheinlichkeit keinen sichtbaren Stromzuwachs. Weiterhin wäre denkbar, dass nur wenige endogene SUR-Proteine als Bindungspartner für die heteromeren Kanäle vorlagen. Bei den schlecht leitenden, mutierten Kanälen würde diese geringe Zahl einen deutlichen Unterschied in der Membranleitfähigkeit bewirken, beim hervorragend leitenden Wildtyp hingegen nicht.

Die Abhängigkeit der Kanalaktivität vom intrazellulären ATP:ATP-Verhältnis legte die Vermutung nahe, dass bei den A167V-Heteromeren eine pharmakologische Beeinflussung analog zu den pankreatischen K_{ATP} -Kanälen möglich sein könnte. Daher wurde versucht, durch Kaliumkanalöffner bzw. -hemmer einen solchen Effekt zu erzielen.

Als Kanalöffner wurde Diazoxid verwendet. Wie weiter oben beschrieben führt diese Substanz über eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle zu einer Hyperpolarisation der pankreatischen Inselzellen, was die Insulinfreisetzung verringert und somit den Blutzucker erhöht. Weiterhin führt es bei rascher intravenöser Gabe zu einer Vasodilatation und wirkt dadurch blutdrucksenkend.

Diazoxid wird bei kongenitalem Hyperinsulismus sowie bei inoperablen B-Zell-Tumoren (Insulinomen) therapeutisch angewendet [36].

Als Kanalblocker kam Tolbutamid zum Einsatz, das wie das oben erwähnte Glibenclamid ein Sulfonylharnstoff ist. Die Sulfonylharnstoffe besitzen eine hohe Selektivität für SUR1 und führen zum Schließen der pankreatischen K_{ATP} -Kanäle und damit zur Insulinausschüttung. Sie werden aufgrund ihrer blutzuckersenkenden Wirkung als orale Antidiabetika in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Tolbutamid besitzt im Vergleich zu den anderen Sulfonylharnstoffen jedoch eine relativ geringere Bindungsaffinität zum Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) [37].

Als Grund, wieso keiner der beiden Stoffe eine Änderung der Ströme bewirken konnte, kommen mehrere Erklärungen in Betracht. Zum einen sind in beiden Fällen für die Wirkung Sulfonylharnstoffrezeptoren nötig. Es ist davon ausgegangen worden, dass diese endogen in den CHO-Zellen vorkommen und die Aktivierung durch das erniedrigte ATP:ADP-Verhältnis vermittelt haben. Kommt aber SUR2, an dem beide Wirkstoffe schlechter wirken, oder schlicht gar kein Sulfonylharnstoffrezeptor endogen vor, so verhindert das die Beeinflussung durch die genannten Pharmaka. Zum anderen wäre es denkbar, dass die verwendete Konzentration von 10 μ M zu gering war. Auf eine weitere Erhöhung ist aber verzichtet worden, da höhere Konzentrationen *in vivo* nicht erreicht werden sollten und somit auch eine erfolgreiche Verbesserung der Kanalfunktion durch höhere Konzentrationen keine therapeutische Relevanz hätte.

4.5 Ausblick

Auf welche Weise die A167V-Mutation krankheitsverursachend ist, ist strittig. Diese Arbeit unterstützt die Theorie, dass der Phänotyp durch eingeschränkt funktionelle KCNJ10/KCNJ16-Heteromere verursacht wird. Diese Heteromere sind bisher nur in Niere und Retina nachgewiesen [30]. Die A167V-homozygoten Patienten weisen jedoch neben der Tubulopathie auch eine Innenohrschwerhörigkeit, eine Gangataxie sowie eine fragliche Epilepsie auf [13].

Wie genau es bei diesen Patienten zu Ataxie und Innenohrschwerhörigkeit kommt, könnte in weiteren Untersuchungen herausgefunden werden. Möglicherweise assoziiert KCNJ10 hier mit einem anderen Vertreter der KCNJ-Gruppe, wodurch ähnlich eingeschränkt funktionelle heteromere Kanäle entstehen könnten [13]. Diese hypothetischen Partnerproteine könnten identifiziert werden. Auf der anderen Seite wäre es auch denkbar, dass es durch einen gestörten intrazellulären Transport und einer damit verbundenen gestörten Oberflächenexpression zum Phänotyp kommt [17].

Weiterhin bleibt unklar, ob der beobachtete Einfluss der ATP:ADP-Ratio nur bei der A167V-Mutante, aber nicht beim Wildtyp vorliegt, und ob er tatsächlich durch Assoziation mit endogen vorkommenden SUR-Proteinen zustande kommt.

Man könnte daher die Expression von SUR-Proteinen in CHO-Zellen und im humanen distalen Tubulus untersuchen. Auch wäre es möglich, durch eine Ko-Expression von SUR2B mit KCNJ10/KCNJ16 die Stöchiometrie mit 2:1:1 so zu beeinflussen, dass mehr oder weniger alle Kanäle mit SUR assoziieren können. Da der kardiale K_{ATP} -Kanal auch nicht auf Diazoxid und nur in hohen Dosen auf Sulfonylharnstoffe anspricht [31], ließen sich die misslungenen Versuche mit Tolbutamid und Diazoxid vielleicht erfolgreicher mit Cromakalim oder Pinacidil wiederholen.

Diese weiteren Erkenntnisse können dazu beitragen, die physiologische Rolle von KCNJ10 und KCNJ16 sowie die Pathophysiologie des EAST-Syndroms besser zu verstehen. Insbesondere könnten diese Experimente zu einer möglichen medikamentösen Therapie führen.

5 Zusammenfassung

KCNJ10 ist ein einwärtsgerichteter Kaliumkanal, der in der Niere, im ZNS und im Innenohr exprimiert wird. In der Niere kommt er als Heteromer mit KCNJ16, einem verwandten Kanalprotein, vor. Mutationen von KCNJ10 lösen ein von Epilepsie, Ataxie, sensorineuraler Taubheit und Salzverlust-Tubulopathie geprägtes Krankheitsbild aus, das autosomal-rezessive EAST- bzw. SeSAME-Syndrom. Bisher sind 14 Mutationen beschrieben, die zu dieser Erkrankung führen. Hierbei nimmt die Mutation A167V eine Sonderstellung ein, denn sie weist nur einen geringgradigen Funktionsverlust auf, der die Symptome der Patienten nicht hinreichend erklärt.

Bei Ko-Expression von KCNJ10 A167V mit seinem physiologischen Partner KCNJ16 fanden manche Arbeitsgruppen eine deutliche Funktionseinschränkung des resultierenden Heterotetramers, andere Arbeitsgruppen hingegen nicht. Ziel dieser Arbeit war es, die elektrophysiologischen Eigenschaften der KCNJ10 Mutation A167V als Homomer und in heteromerer Expression mit KCNJ16 zu charakterisieren. Dazu wurden Ganzzell-Patch-Clamp-Experimenten an CHO-Zellen und Einzelkanalmessungen an HEK-Zellen durchgeführt. Somit konnte eine bessere Einsicht in den Pathomechanismus des EAST-Syndroms im Allgemeinen und der A167V-Mutation im Speziellen gewonnen werden.

Zunächst konnte mit einem Strom von 64 % des Wildtyp-Stromes die hohe Restfunktion der A167V-Mutation bei homomerer Expression bestätigt werden. Durch die Heteromerisation mit KCNJ16 wurde er auf ca. 11 % im Vergleich zu Wildtyp-Heteromeren reduziert. Aufgrund der Einzelkanalmessungen von KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren kann vermutet werden, dass die Funktionseinschränkung der A167V-Mutation auf einer verringerten Offenwahrscheinlichkeit bei gleichbleibender Leitfähigkeit beruht. Weiterhin wurde eine Aktivierung der A167V-Heteromere durch eine erhöhte intrazelluläre ADP:ATP-Ratio beobachtet.

Da bei dieser Mutation nur die Heteromere deutlich beeinträchtigt sind, die Patienten aber krank sind, lässt sich schlussfolgern, dass KCNJ10/KCNJ16-Heteromere die wesentlichen basolateralen Kaliumkanäle im distalen Tubulus darstellen. Die Fehlfunktion dieser Heteromere ist für die Nierensymptomatik beim EAST-Syndrom verantwortlich. Ob (beziehungsweise mit welchen anderen Kanälen) KCNJ10 im ZNS und im Innenohr Heteromere bildet, und damit auch die Frage, wieso es bei den A167V-Patienten überhaupt zu Innenohrschwerhörigkeit und Ataxie kommt, bleibt offen. Jedoch lässt die Tatsache, dass eine Aktivierung der mutierten Kanäle prinzipiell möglich ist, auf eine ähnliche Wirkung durch Medikamente hoffen.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Schmidt RF, Lang F. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 30th ed. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.
2. Reilly RF, Ellison DH. Mammalian Distal Tubule: Physiology, Pathophysiology, and Molecular Anatomy. *Physiological Reviews*. 2000;80:277–313.
3. Bandulik S, Schmidt K, Bockenhauer D, Zdebik AA, Humberg E, Kleta R, et al. The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflügers Arch*. 2011;461:423–35.
4. Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand*. 1958;42:298–308.
5. Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, et al. An inward rectifier K⁺ channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *The Journal of Physiology*. 2002;538:391–404.
6. Lachheb S, Cluzeaud F, Bens M, Genete M, Hibino H, Lourdel S, et al. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2008;294:F1398–407.
7. Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp, Annemiete W C M, Loffing J, Hoenderop, Joost G J, Bindels, René J M. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J. Clin. Invest*. 2005;115:1651–58.
8. Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, et al. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N. Engl. J. Med*. 2009;360:1960–70.
9. Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Häusler MG, Grimmer J, et al. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:5842–47.
10. Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, et al. KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107:14490–95.

11. Freudenthal B, Kulaveerasingam D, Lingappa L, Shah MA, Brueton L, Wassmer E, et al. KCNJ10 mutations disrupt function in patients with EAST syndrome. *Nephron Physiol.* 2011;119:p40-8.
12. Scholl UI, Dave HB, Lu M, Farhi A, Nelson-Williams C, Listman JA, et al. SeSAME/EAST syndrome--phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatr. Nephrol.* 2012;27:2081–90.
13. Parrock S, Hussain S, Issler N, Differ A, Lench N, Guarino S, et al. KCNJ10 mutations display differential sensitivity to heteromerisation with KCNJ16. *Nephron Physiol.* 2013;123:7–14.
14. Tang X, Hang D, Sand A, Kofuji P. Variable loss of Kir4.1 channel function in SeSAME syndrome mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;399:537–41.
15. Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, Nichols CG. Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J. Biol. Chem.* 2010;285:36040–48.
16. Williams DM, Lopes, Coeli M B, Rosenhouse-Dantsker A, Connelly HL, Matavel A, O-Uchi J, et al. Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010;21:2117–29.
17. Tanemoto M, Abe T, Uchida S, Kawahara K. Mislocalization of K(+) channels causes the renal salt wasting in EAST/SeSAME syndrome. *FEBS Lett.* 2014.
18. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 1997;59:171–91.
19. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 2005;57:509–26.
20. Abraham MR, Jagangir A, Alekseev AE, Terzic A. Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J.* 1999;13:1901–10.
21. Doyle DA. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science.* 1998;280:69–77.
22. Takumi, T., Ishii, T., Horio, Y., Morishige, K., Takahashi, N., Yamada, M. A Novel ATP-dependent Inward Rectifier Potassium Channel Expressed Predominantly in Glial Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270:16339–46.
23. Pessia M, Tucker SJ, Lee K, Bond CT, Adelman JP. Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. *EMBO J.* 1996;15:2980–87.
24. Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2002;282:C403-7.

-
25. Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, et al. An inwardly rectifying K channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2001;281:C922–C931.
 26. Poopalasundaram, S., Knott, C., Shamotienko, O. G., Foran, P. G., Dolly, J. O., Ghiani, C. A., Gallo, V. and Wilkin, G. P. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia*. 2000;30:362–72.
 27. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiology*. 2000;525:587–92.
 28. Konstas A, Korbmacher C, Tucker SJ. Identification of domains that control the heteromeric assembly of Kir5.1/Kir4.0 potassium channels. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 2003;284:C910-7.
 29. Ishii M, Fujita A, Iwai K, Kusaka S, Higashi K, Inanobe A, et al. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2003;285:C260-7.
 30. Hibino H, Higashi-Shingai K, Fujita A, Iwai K, Ishii M, Kurachi Y. Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir5.1, in specific types of fibrocytes in the cochlear lateral wall suggests its functional importance in the establishment of endocochlear potential. *Eur J Neurosci*. 2004;19:76–84.
 31. Seino S. ATP-sensitive potassium channels: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. *Annu. Rev. Physiol*. 1999;61:337–62.
 32. Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J*. 1997;16:1145–52.
 33. Tammaro P, Ashcroft FM. Keeping the heart going: a new role for KATP channels. *J. Physiol. (Lond.)*. 2006;577:767.
 34. Shi W, Yang Y, Shi Y, Jiang C. K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2012;64:1–13.
 35. Dong K, Xu J, Vanoye CG, Welch R, MacGregor GG, Giebisch G, et al. An amino acid triplet in the NH2 terminus of rat ROMK1 determines interaction with SUR2B. *J. Biol. Chem*. 2001;276:44347–53.
 36. Estler CJ, Schmidt H. *Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis ; mit 281 Tabellen*: Schattauer; 2007.
 37. Offermanns S. Antidiabetika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, editors. *Pharmakologie & Toxikologie. Springer-Lehrbuch*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 602–22.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nephronabschnitte mit dazugehörigem Epithel	
Modifiziert nach Schmidt, Lang 2007 [1]	1
Abbildung 2: Transportprozesse im distalen Konvolut (DCT).....	3
Abbildung 3: Struktur von KCNJ-Kanälen	
Entnommen aus Parrock <i>et al.</i> 2013 [13].....	4
Abbildung 4: Membrantopologie von KCNJ10.....	5
Abbildung 5: Auswirkung von KCNJ10-Mutationen auf die Elektrolytresorption im DCT.....	5
Abbildung 6: Heteromerisation mit KCNJ16	6
Abbildung 7: Patchpipette im Bad.....	16
Abbildung 8: Patch-Clamp-Konfigurationen.....	17
Abbildung 9: Beispielhaftes Ganzzellexperiment	18
Abbildung 10: Ruhemembranpotentiale transfizierter CHO-Zellen.....	20
Abbildung 11: U/I-Diagramme bei homomerer Expression von KCNJ10.....	21
Abbildung 12: U/I-Diagramme bei heteromerer Expression mit KCNJ16.....	22
Abbildung 13: Ströme bei Magnesium-freier Pipettenlösung.....	23
Abbildung 14: Ströme bei Pipettenlösung mit je 1,5 mM ATP und ADP und 3 mM Phosphat...23	
Abbildung 15: Ströme bei Pipettenlösung mit je 1,5 mM ATP und ADP.....	24
Abbildung 16: Ströme bei Pipettenlösung mit 1,5 mM ATP	24
Abbildung 17: Ganzzellströme vor und nach Gabe von Diazoxid bzw. Tolbutamid	25
Abbildung 18: „Run-Down“ nach Bildung der Inside-Out Konfiguration.....	26
Abbildung 19: Multichannelpatch (J10/J16-Wildtyp-Heteromere).....	26
Abbildung 20: Einzelkanalmessung von KCNJ10/KCNJ16 Wildtyp- Kanälen.....	27
Abbildung 21: Einzelkanalmessungen von KCNJ10 A167V/KCNJ16 Kanälen.....	27
Abbildung 22: Einzelkanalmessung von Wildtyp-Heteromeren mit sub-states	27
Abbildung 23: Aufbau des pankreatischen K_{ATP} -Kanals	
Entnommen aus Seino 1999 [31].....	33
Abbildung 24: Funktion ATP-abhängiger K^+ -Kanäle	
Entnommen aus Freissmuth, Offermanns, Böhm 2012 [37].	34

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung publizierter Ergebnisse zu KCNJ10 A167V	7
Tabelle 2: Ringerlösung	9
Tabelle 3: Ringer Hochkalium 15	9
Tabelle 4: Ringer Hochkalium 50	9
Tabelle 5: Barium in Ringer.....	10
Tabelle 6: Diazoxid in Hochkalium 50	10
Tabelle 7: Tolbutamid in Hochkalium 50	10
Tabelle 8: Pipettenlösung 4.....	10
Tabelle 9: Mg ²⁺ -freie Pipettenlösung	10
Tabelle 10: Pipettenlösung mit ADP und Phosphat	11
Tabelle 11: Pipettenlösung mit ADP.....	11
Tabelle 12: Pipettenlösung mit niedrigem ATP	11
Tabelle 13: Referenzelektrodenlösung.....	12
Tabelle 14: CHO-Medium	12
Tabelle 15: HEK-Medium.....	12
Tabelle 16: Coating-Medium	12
Tabelle 17: Zellarten	12
Tabelle 18: Plasmide	12
Tabelle 19: Geräte	13
Tabelle 20: Verbrauchsmaterial	13
Tabelle 21: Substanzen	13
Tabelle 22: Verwendete Software	14

6.4 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CC	<i>current clamp</i>
CCD	kortikaler Teil des Sammelrohrs (<i>cortical collecting duct</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenmerkmal)
CHO-Zellen	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (<i>chinese hamster ovary</i>)
CLCKB	Basolateraler Chloridkanal
CNT	Verbindungsstück (<i>connecting tubule</i>)
COS-Zellen	Zelllinie aus Affennieren (<i>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i>)
DCT	Distales Konvolut (<i>distal convoluted tubule</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
HEK-Zellen	Zelllinie aus embryonaler Niere (<i>human embryonic kidney 293</i>)
K _{ATP}	ATP-sensitive Kaliumkanäle
K _{ir}	einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (<i>inwardly rectifying</i>)
MAGI-1	<i>Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1</i>
MDCKII	Zelllinie aus Hundenieren (<i>Madin Darby canine kidney</i>)
MEM	<i>minimum essential medium</i>
Na ⁺ /K ⁺ -APTase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase, Natrium-Kalium-Pumpe
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter 2
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor (<i>sulfonylurea receptor</i>)
TAL	dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife (<i>thick ascending limb</i>)
TRPM6	<i>transient receptor potential channel melastatin 6</i>
VC	<i>voltage clamp</i>
V _C	Klemmspannung
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Warth für eine ausgesprochen freundliche Betreuung sowie dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte und stets wertvolle Anregungen und Ideen bereithielt.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe bedanken, die meine Zeit im Labor zu einer sehr lehrreichen und oft lustigen Erfahrung machten.

Insbesondere unterstützten mich die folgenden Personen bei meiner Arbeit:

Franziska Scherl, Markus Reichold, Anna Ratermann und Richard Warth führten mich in die Patch-Clamp-Technik ein.

Ines Tegtmeier, Christina Sterner und Julia Stindl sorgten durch die Pflege und Elektroporation der Zellen dafür, dass ich meine Versuche durchführen konnte.

Evelyn Humberg unterstütze mich bei der Auswertung der Ergebnisse und beim Schreiben dieser Arbeit. Bei Fragen konnte sie mir stets weiterhelfen. Markus Reichold gab mir eine Vielzahl von Hinweisen und Verbesserungsvorschlägen, die diese Arbeit weiterbrachten.

Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

7.2 Lebenslauf

7.3 Eidesstattliche Erklärung

nach § 6 Absatz 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 18.01.2016

Felizitas Tondorf